

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudio preliminar de la diversidad genética del género**

***Puccinia* presente en Poaceae en la Sierra Ecuatoriana**

**con énfasis en *Puccinia striiformis***

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en

Ciencias Biológicas

**CARLA E. VIVANCO CÁRDENAS**

Quito, 2013

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Carla Elizabeth Vivanco Cárdenas ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

María Eugenia Ordoñez, Ph. D.

Directora de la Disertación

Quito, 4 de Noviembre del 2013

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por haberme abierto sus puertas y haber aportado en mi formación académica y como ser humano, por apoyarme en el logro de mis objetivos y por financiar la realización de este proyecto

Agradezco a mi familia, a mi padre, por todos los años que dedico para apoyarme tanto económicamente como moralmente y con su ejemplo para poder alcanzar todos mis sueños; a mi madre Adriana Cárdenas por haber sido mi soporte, mi guía y por ser mi mejor amiga durante los momentos más difíciles de mi carrera. A mi hermana Karina Vivanco, por ser mi compañera de vida y mi amiga, a mis hermanos Lenin y Alex Vivanco y a sus esposas Alicia Munive y Soraya Carrera, que a pesar de la distancia siempre han estado presentes. A todos ustedes les dedico esta Tesis.

Agradezco a María Eugenia Ordoñez por haberme otorgado esta gran oportunidad para realizar estos estudios. Por su ejemplo como ser humano, su apoyo incondicional y guía.

A los miembros del tribunal, a Alexandra Narváez y a Rommel Montúfar por sus valiosos consejos y aportes al presente documento.

A Charlie Barnes, por compartirme su tiempo, su experiencia científica y su orientación.

Al Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, por permitirme realizar una parte de mi tesis en sus instalaciones, especialmente quisiera agradecer a Mayra Cathme por su apoyo y guía durante todo el tiempo que trabaje allí.

A la Universidad de Washington State, por acogerme dentro su establecimiento, donde tuve la oportunidad de realizar las investigaciones necesarias para esta tesis, especialmente al doctor Xianming Chen por permitirme trabajar en su programa; además quisiera mostrar mi gratitud hacia todas las personas que me transmitieron su conocimiento y me ayudaron en el laboratorio de fitopatología y en los invernaderos: Meinan Wang, Anming Wang y el Dr. Kent Evans.

Agradezco al Dr. Javier Carvajal por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales durante las pruebas con microsatélites; quisiera agradecer también a Patricia Portero y a Ana Troya por transmitirme su conocimiento y por su apoyo durante este período.

Agradezco a Sarah Hambleton del Eastern Cereal Oilseed Research Center en Canadá por el aporte otorgado de los análisis de microsatélites de las cepas de *P. striiformis* f.sp. *tritici* ecuatorianas.

Agradezco también a todos mis compañeros y amigos que estuvieron presentes durante toda mi carrera, especialmente quisiera agradecer a Alejandro S., Carolina B, David Velalcazar, David Vergara, Diego O., Andrea P., Gabriela B., Andrea Z., Sandra M., Andrea B., Johita V. y Carina C. por haber compartido conmigo tantas experiencias agradables y por haberme brindado su apoyo incondicional. Un agradecimiento especial para Nicholas Kennedy, por haberme ofrecido su compañía y su apoyo durante mis estudios de investigación en Washington.

A todos muchas Gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. GENERALIDADES DE LAS ROYAS.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2. CICLO DE VIDA.....</b>	<b>5</b>
<b>3.3. GÉNERO PUCCINIA.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4. LA ROYA AMARILLA DEL TRIGO.....</b>	<b>9</b>
<b>3.5. SITUACIÓN DEL TRIGO EN EL ECUADOR.....</b>	<b>10</b>
<b>3.6. TIPOS DE RESISTENCIA GENÉTICA DE LA PLANTA HACIA EL         PATÓGENO.....</b>	<b>12</b>
<b>3.7. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.7.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>

3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1. RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DEL GÉNERO <i>PUCCINIA</i> EN POACEAE TRIGO.....	16
4.2. IDENTIFICACIÓN DEL HOSPEDERO.....	17
4.3. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS-1 E ITS-2 DEL ADN RIBOSOMAL.....	17
4.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	19
4.5. OBTENCIÓN DE MONOSPÓRICOS Y MULTIPLICACIÓN DE ESPORAS.....	20
4.6. PRUEBAS DE VIRULENCIA.....	22
4.7. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA CON MICROSATÉLITES.....	24
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS HOSPEDEROS POR GÉNERO.....	27
5.2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ROYAS POR HOSPEDERO.....	27
5.3. FILOGENIA.....	28
5.4. PRUEBAS DE VIRULENCIA.....	30
5.5. ANÁLISIS DE DIVERISIDAD GENÉTICA CON MICROSATÉLITES....	31

<b>6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>6.1. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE ROYAS DEL GÉNERO <i>PUCCINIA</i> EN POACEAE.....</b>	<b>34</b>
<b>6.2. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> EN EL TRIGO.....</b>	<b>39</b>
6.2.1. ANÁLISIS DE LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS ECUATORIANAS..	39
6.2.2. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA CON MICROSATÉLITES..	41
<b>7. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>45</b>
<b>8. FIGURAS.....</b>	<b>52</b>
<b>9. TABLAS.....</b>	<b>57</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Árbol del análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de la región ITS1, 5.8s e ITS-2 del género <i>Puccinia</i> .....	53
<b>Figura 2</b>	Frecuencia de virulencia de las cepas de <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ecuatorianas hacia los 20 diferenciales de <i>Triticum aestivum</i> .....	55
<b>Figura 3</b>	Análisis de coordenadas principales según la virulencia de <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> en 20 plantas diferenciales de trigo.....	55
<b>Figura 4</b>	Análisis de coordenadas principales según la distancia genética de 14 loci de microsatélites de <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> .....	56



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Muestras de <i>Puccinia</i> colectadas en las Provincias de Pichincha, Napo, Tungurahua, Carchi y Bolívar para el estudio de la diversidad genética del género <i>Puccinia</i> en Poaceae y muestras de <i>Uromyces</i> y <i>Edythea</i> presentes en los hospederos de las familias Juncaceae, Crocoideae y Berberidaceae.....	58
<b>Tabla 2</b>	Muestras de <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> colectadas de hojas de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) en las provincias de Pichincha, Carchi y Chimborazo.....	64
<b>Tabla 3</b>	Cebadores utilizados para la identificación de royas y hospederos del género <i>Puccinia</i> en Poaceae.....	65
<b>Tabla 4</b>	Combinaciones de cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal de las muestras analizadas y su temperatura de hibridación.....	65
<b>Tabla 5</b>	Cultivares de plantas diferenciales del trigo utilizados para evaluar razas de <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> .....	66
<b>Tabla 6</b>	Cebadores de microsatélites utilizados para <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> .....	67

<b>Tabla 7</b>	Número de especies de royas identificadas por hospedero.....	68
<b>Tabla 8</b>	Resultados de las pruebas de virulencia de <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> en 20 diferenciales de trigo.....	70
<b>Tabla 9</b>	Matriz de distancias genéticas basada en la virulencia de las 9 cepas ecuatorianas y 2 cepas de Estados Unidos (usadas como control) de <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> en los 20 diferenciales de trigo.....	71
<b>Tabla 10</b>	Frecuencias alélicas para cada loci de microsatélites de muestras de <i>Puccinia striiformis</i> f.sp <i>tritici</i> .....	72
<b>Tabla 11</b>	Índices estadísticos promedio de los 14 loci de las cepas de <i>Puccinia</i> <i>striiformis</i> f.sp <i>tritici</i> analizadas.....	73
<b>Tabla 12</b>	Índices estadísticos promedio de los 14 loci de las cepas de <i>Puccinia</i> <i>striiformis</i> f.sp <i>tritici</i> analizadas.....	74

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Ciclo de vida de <i>Puccinia graminis</i> (Macrocíclica-heteroecia).....	76
<b>Anexo 2</b>	Protocolo de extracción de ADN con Tiocianato de Guanidina.....	77
<b>Anexo 3</b>	Obtención de monospóricos y multiplicación de esporas.....	80
<b>Anexo 4</b>	Siembra de semillas de diferenciales, en donde cada bandeja corresponde a 1 cepa, cada cepa posee 4 macetas, en las cuales se sembraron 5 semillas de cada raza de trigo específica para cada gen de resistencia.....	82
<b>Anexo 5</b>	Metodología para pruebas de Virulencia.....	83
<b>Anexo 6</b>	Escala de virulencia de <i>Puccinia striiformis</i> en hojas de Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ).....	87
<b>Anexo 7</b>	Escala básica y expandida para el análisis de los tipos de infección de <i>Puccinia striiformis</i> en plantas adultas de Trigo.....	87
<b>Anexo 8</b>	Protocolo de extracción de ADN de alto rendimiento para royas.....	88
<b>Anexo 9</b>	Protocolo para el análisis de microsatélites a partir de la electroforesis en geles de poliacrilamida (Chen <i>et al.</i> ).....	90
<b>Anexo 10</b>	Protocolo para Geles de Poliacrilamida (Tinción por Plata).....	96

## 1. RESUMEN

El género *Puccinia*, es uno de los géneros más destructivos a nivel económico agrícola, ocasiona severas enfermedades en la mayoría de cereales y en otros cultivos. En el Ecuador, existe poco conocimiento sobre este grupo de hongos, tanto desde el punto de vista biológico como en su taxonomía. Los objetivos del presente estudio fueron identificar especies de *Puccinia* provenientes de pastos de la zona andina del Ecuador en base a la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal de 69 muestras colectadas en 5 provincias diferentes; y determinar la diversidad genética de 9 cepas de *P. striiformis* f.sp. *tritici* (*Pst*) provenientes de campos de trigo de la sierra ecuatoriana mediante análisis de virulencia para 20 genes de resistencia en trigo y de microsatélites en 14 loci.

El análisis filogenético mostró 4 clados para el género *Puccinia* en Ecuador (*P. coronata*, *P. striiformis sensu lato*, *P. holcina* y *P. graminis*). Además, se reporta la presencia de *Edythea quitensis*, 2 especies del género *Uromyces*, y 9 cepas de *Puccinia* que no pudieron ser identificadas por análisis moleculares. Se encontró una alta diversidad en hospederos infectados por royas que incluían a 8 géneros pertenecientes a la familia Poaceae y 3 a las familias Berberidaceae, Juncaceae y Crocoideae. En cuanto a las pruebas de virulencia en *Pst* se encontró virulencia para 16 genes de resistencia en trigo, incluyendo a los genes Yr8 y Yr10 que anteriormente fueron efectivos, indicando un incremento de la virulencia en las poblaciones de *Pst* en los últimos años. La resistencia ofrecida por los genes Yr5 y Yr15 se mantiene efectiva y se recomienda su inclusión en el desarrollo de nuevas variedades de trigo resistentes. Se detectó la presencia de las razas Pstv-14, Pstv-11 y Pstv49 (según Wan & Chen, 2012) y de 5 razas. La presencia de diferentes razas virulentas se atribuye a la selección

impuesta sobre las poblaciones del hongo por la resistencia presente en las variedades locales de trigo. Los análisis de diversidad genética con microsatélites indican que las cepas de *Pst* son diferentes entre sí y sugieren además que las poblaciones se reproducen de manera asexual. El estudio no encontró evidencia de reproducción sexual en *Berberis*. Hubo baja correlación entre las distancias genéticas basadas en microsatélites y las de virulencia.

El presente estudio muestra una alta diversidad del género *Puccinia* en el Ecuador, en cuanto a especies encontradas, así como en los patrones de virulencia y microsatélites de *Pst*. La información obtenida sirve para documentar la ocurrencia del género *Puccinia* en gramíneas locales y para seleccionar variedades de trigo que posean genes de resistencia efectivos contra las poblaciones locales de roya amarilla en el Ecuador. Se recomienda realizar estudios adicionales del género *Puccinia* en Poaceae y en otras familias de plantas, para ampliar el conocimiento de este género en el Ecuador.

Palabras clave: diversidad genética, *forma specialis*, monospórico, microsatélites, *Puccinia*, raza, roya, virulencia.

## 2. ABSTRACT

The genus *Puccinia*, is one of the most destructive genera at an economic and agricultural level, since it can cause severe diseases in most cereals and other agricultural crops. Little is known about this group of fungi in Ecuador, both from a biological and taxonomic point of view. The objectives of this study were to identify *Puccinia* species from grasses in the Ecuadorian highlands based on the sequence of ITS region of the ribosomal DNA of 69 samples collected in five provinces; and to determine the genetic diversity of 9 samples of *P. striiformis* f.sp. *tritici* (*Pst*) from wheat fields through virulence analysis of 20 resistance genes in wheat, and microsatellite analysis from 14 loci.

The phylogenetic analysis showed four clades for the genus *Puccinia* in Ecuador (*P. coronata*, *P. striiformis sensu lato*, *P. holcina* and *P. graminis*). Also, the study reports the presence of *Edythea quitensis*, 2 *Uromyces* species, and 9 *Puccinia* strains that could not be identified from molecular analysis. A high diversity of rust infected hosts were found, which included 8 genera that belong to the Poaceae family and 3 more to the Berberidaceae, Juncaceae and Crocoideae families. The virulence tests on *Pst* showed virulence to 16 wheat resistance genes, including Yr8 and Yr10 which were previously effective, showing an increase in virulence of *Pst* in the last years. Resistance from genes Yr5 and Yr15 is still effective, and it is recommended to include these genes in the development of new wheat varieties. The presence of races Pstv-14, Pstv-11 and Pstv-49 (according to Wan & Chen, 2012) and 5 different races was detected. The appearance of new virulent races is attributed to the selection pressure imposed on the fungal population by the resistance present in the local wheat varieties. The genetic diversity analysis with microsatellite markers showed that the

strains of *Pst* were different between them, and also suggests that the populations reproduce asexually. The study did not find evidence of sexual reproduction on *Berberis*. There was a low correlation between the genetic distances obtained from microsatellite markers and from the virulence data.

The present study shows a high diversity of the genus *Puccinia* in Ecuador, in relation to species found, and also virulence and microsatellite diversity of *Pst*. The data obtained documents the occurrence of the genus *Puccinia* on local grasses, and could be used to select wheat varieties that have effective resistance genes against the local population of yellow rust in Ecuador. Additional studies regarding the genus *Puccinia* in Poaceae and other plant families are recommended, to increase its knowledge in Ecuador.

Key words: genetic diversity, *forma specialis*, monosporic, microsatellite markers, *Puccinia*, race, rust, virulence.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. GENERALIDADES DE LAS ROYAS**

Las royas (Clase Urediniomycetes, Orden Uredinales, Filum Basidiomycetes), representan a uno de los grupos de hongos fitopatógenos más diversos y de amplia distribución en el mundo (Zuluanga & Buriticá, 2008). Son parásitos obligados y tienen una alta especificidad a sus hospedantes (Zuluanga & Buriticá, 2008), que comprenden un amplio rango de plantas, incluidos Pteridofitas, Gimnospermas y Angiospermas (Monocotiledóneas y Dicotiledóneas) (Kolmer *et al.*, 2009). Se caracterizan por parasitar hospederos saludables y vigorosos (Cummins & Hiratsuka, 1991), e inducir en los tejidos de hojas o ramas, la formación de pústulas con esporas anaranjadas que dan una apariencia de óxido; además pueden causar algunas hipertrofias, hiperplasias y malformaciones (Zuluanga & Buriticá, 2008). Debido a su alto potencial epidemiológico, pueden ocasionar devastadoras enfermedades en plantas (Broad Institute, 2010), por lo que se considera a muchas especies de royas importantes a nivel económico, agrícola y forestal (Zuluanga & Buriticá, 2008).

#### **3.2. CICLO DE VIDA**

Las royas poseen los ciclos de vida más complejos dentro del reino Fungi. Pueden presentar hasta cinco estados esporicos que son morfológica y funcionalmente diferentes en un solo hospedero (autoecios) o en varios hospederos taxonómicamente no relacionados (heteroecios) (Zuluanga & Buriticá, 2008). Cada estado esporico se designa como: Espermogonio o Picnia (0), Aecio (I), Uredinio (II), Telio (III) y Basidio (IV). De acuerdo al



número de estados esporicos presentes se reconocen tres ciclos de vida básicos: Las royas macrocíclicas, demicíclicas y microcíclicas. Las royas macrocíclicas presentan todos los estados esporicos, aunque en algunos casos pueden no desarrollar espermogonios. Las royas demicíclicas carecen de esporas tipo aecias o uredias, y las microcíclicas solo desarrollan esporas teliales y basidios, aunque algunas contienen espermogonios (Zuluanga & Buriticá, 2008).

El macrociclo es el más común, pero royas autoecias usualmente se originaron como resultado de temporadas de crecimiento cortas en hospederos que se encuentran en sitios de mayor latitud, altitud o condiciones desérticas (Kolmer *et al.*, 2009).

El ejemplo clásico para describir el ciclo biológico en royas es el de *Puccinia graminis*, que es macrocíclica, heteroecia y es la causante de la roya del tallo en el trigo o en otros cereales y hierbas. El ciclo comienza con la germinación de las teliosporas, producidas en la temporada anterior, después del invierno o verano, usualmente en el tejido muerto de la planta hospedera, dentro de pústulas negras o cafés llamadas telia (Kolmer *et al.*, 2009). Cuando las teliosporas diploides germinan en el hospedero se produce la meiosis dando lugar a cuatro basidiosporas haploides, las cuales a su vez son expulsadas al aire para encontrar al segundo hospedero, debido a que no pueden infectar nuevamente al mismo hospedero de la fase telial (Kolmer *et al.*, 2009). Las basidiosporas son frágiles y no pueden tolerar la sequía por lo que no suelen viajar largas distancias, y son normalmente liberadas durante la noche o durante temporadas húmedas (Kolmer *et al.*, 2009). Por lo tanto, para completar el ciclo de vida ambos hospederos deben tener una proximidad geográfica (Alfen, 2002). Una vez que las basidiosporas han encontrado al segundo hospedero, invaden sus tejidos y forman colonias

haploides denominadas picnia, donde se producen las picniosporas a partir de dos o más tipos de apareamiento. Las picniosporas generalmente se encuentran embebidas de néctar, que atrae a insectos hacia la superficie de la hoja, flores, o ramas del hospedero (Kolmer *et al.*, 2009). Los insectos o la humedad de la superficie de la planta distribuyen las picniosporas en el hospedero o plantas vecinas, resultando en la fertilización, o plasmogamia (unión de dos células para formar una única célula con dos núcleos haploides genéticamente distintos). Una vez que esto ocurre el hongo forma el siguiente estadio espórico, conocido como aecio, que usualmente se produce en el envés de la hoja en forma de hifas dicarióticas, donde cada célula contiene dos núcleos haploides separados (aeciosporas). Las aeciosporas poseen superficies compuestas de proyecciones o platos. Son producidas usualmente en cadenas, y en grandes cantidades, que pueden viajar largas distancias para encontrar un nuevo hospedero. Una vez que han sido depositadas en un nuevo tejido, generalmente en hojas, las aeciosporas germinan rápido e invaden la planta a través del estoma. La infección y la colonia resultan en otra pústula llamada uredinio, que contiene uredioniosporas dicarióticas. Este estadio puede repetirse en el mismo hospedero y puede aumentar en masa rápidamente en pocas generaciones, lo que causa las epidemias. Finalmente, cuando la producción de nutrientes de la planta hospedera empiezan a decaer el estadio uredio se transforma en telio, el cual produce una gran cantidad de teliosporas que generalmente son oscuras y poseen una pared celular gruesa resistente al frío y a la sequía que es necesaria para permanecer latente cuando el hospedero no se encuentra disponible (Kolmer *et al.*, 2009) (Anexo 1).

### 3.3. GÉNERO *PUCCINIA*

El orden Uredinales está conformado por 13 familias, 163 géneros y más de 7000 especies (Hovmøller *et al.*, 2011); dentro de las cuales, el género *Puccinia*, perteneciente a la familia Pucciniaceae, es el más grande de los Uredinales, comprende aproximadamente 3000 a 4000 especies altamente diversas con respecto a la preferencia del hospedero y al número de estadíos espóricos en su ciclo biológico (Hovmøller *et al.*, 2011). Son cosmopolitas, a excepción de las regiones polares (Cummins & Hiratsuka, 1991), y se caracterizan por ser parásitos obligados y por presentar una estrecha coevolución con sus hospedantes vegetales, adaptando su ciclo de vida a las condiciones ecológicas del hábitat de sus hospederos (Zuluanga & Buriticá, 2008). Se les considera el género de hongos biotróficos más destructivo a nivel económico agrícola (Broad Institute, 2010), ya que pueden ocasionar severas enfermedades en la mayoría de cereales y otros cultivos. Por su importancia económica las royas de los cereales han sido estudiadas extensivamente (Cummins & Hiratsuka, 1991).

En cuanto a su taxonomía, basándose en su especificidad con un único hospedero se les han asignado el nivel subespecífico de *forma specialis* (f. sp.) para describir a muchas de las royas. Por ejemplo, *P. graminis* f. sp. *tritici*, ataca específicamente a *Triticum aestivum* (trigo), *P. graminis* f. sp. *avenae*, es parásita de *Avena sativa* (avena) y *P. graminis* f. sp. *secalis* ataca a *Secale cereale* (centeno) (Kolmer *et al.*, 2009). Además de la *forma specialis* para un único hospedero también existen variantes de virulencia hacia los diferentes genes de resistencia de las plantas hospederas (Kolmer *et al.*, 2009). A este nivel, las royas son clasificadas por razas.

Una de las regiones neotropicales donde existe un alto número de especies, y donde se posee el menor conocimiento sobre este grupo de organismos, tanto desde el punto de vista biológico como en lo relacionado a su taxonomía, es la zona altoandina que comprende una franja altitudinal entre 2.000 a 4.600 msnm. Este nicho ecológico ofrece condiciones físicas y biológicas ideales para la supervivencia de royas poco abordadas en los estudios micológicos mundiales (Zuluanga & Buriticá, 2008). Esta situación contrasta con la gran importancia económica que presenta este género en diversos agroecosistemas tropicales relevantes ya que en estas zonas se producen diversos cultivos de cereales, como: maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*), entre otros (Zuluanga & Buriticá, 2008).

### **3.4. LA ROYA AMARILLA DEL TRIGO**

El trigo harinero (*Triticum aestivum*) es el cultivo con mayor superficie en el mundo, su volumen de cosecha es mayor que el de cualquier otro alimento (Flores *et al.*, 2009). La producción de este cereal se ve afectada principalmente por enfermedades causadas por el género *Puccinia*, entre las cuales se encuentra la roya amarilla (*P. striiformis* f. sp. *tritici*), que es un parásito obligado del trigo y de otras hierbas, de los cuales obtiene el agua y los nutrientes necesarios para reproducirse y completar su ciclo de vida (Chen, 2005). Las epidemias causadas por este hongo se producen normalmente en áreas templadas o de gran altura, donde existen las condiciones de humedad y temperatura óptimas (10 a 18°C) para la germinación e infección de las esporas (Chen, 2005). La roya amarilla tiene un ciclo de vida heteroecio que involucra los 5 estadios esporicos, donde el cereal es el hospedero primario y

*Berberis* sp. podría ser el hospedero secundario donde se completa la reproducción sexual (Jin *et al.*, 2010). La infección del tejido verde en el trigo (hospedero primario) se puede producir en cualquier momento del desarrollo de la planta, desde el estadio de una hoja hasta cuando la planta se encuentra totalmente madura (Chen, 2005). Los síntomas aparecen aproximadamente 1 semana después de la infección, bajo condiciones óptimas de temperatura, en donde se producen lesiones en la hoja correspondientes a la fase uredinal del hongo, cada pústula puede producir uredioniosporas por un largo período de tiempo mientras se expande de manera longitudinal a través del tejido (Hovmøller *et al.*, 2011). Una vez que la infección se ha diseminado por todo el cultivo, puede reducir la cantidad y la calidad de la cosecha del grano. Las semillas producidas por cosechas infectadas tienen un bajo vigor y una pobre germinación (Chen, 2005). La roya amarilla puede causar hasta el 100% en pérdidas del rendimiento en variedades susceptibles (Ochoa, 2003).

### **3.5. TIPOS DE RESISTENCIA GENÉTICA DE LA PLANTA HACIA EL PATÓGENO**

La resistencia del trigo hacia las enfermedades se encuentra genéticamente controlada por la presencia de uno o varios genes (Agrios, 1997). Cada uno de estos genes de resistencia es específico a un gen de avirulencia del patógeno, esta interacción entre genes es conocida como relación gen por gen (Priyamvada *et al.*, 2011) y se ha convertido en el principio central en la patología de plantas. Esta interacción se produce de dos formas, la primera cuando el hospedero reconoce la invasión del patógeno y se produce una respuesta incompatible, la cual se expresa como muerte hipersensitiva de las células del hospedero generando necrosis o

clorosis alrededor de la pústula del patógeno. Por otro lado, las interacciones compatibles entre el hospedero y el patógeno, se producen cuando la planta no puede reconocer al patógeno debido a que las razas del patógeno no poseen los genes de avirulencia correspondientes, o el hospedero no posee los genes de resistencia específicos dando como resultado la infección (Kolmer *et al.*, 2009).

La resistencia en plantas está dada por dos tipos: resistencia horizontal y resistencia vertical. La resistencia horizontal o cuantitativa no es específica a las razas del patógeno debido a que se encuentra controlada por varios genes (genes menores) que presentan una acción génica principal o parcialmente recesiva (Sandoval-Islas *et al.*, 2002). Este tipo de resistencia no protege a la planta de ser infectada, pero retarda el desarrollo de la infección, la dispersión y la epidemia en el cultivo (Agrios, 1997). Las variedades que poseen este tipo de resistencia son más durables ya que el patógeno debe generar más mutaciones para romper la resistencia de la planta. Por otro lado, la resistencia vertical o cualitativa es específica a las razas del patógeno, es decir, que en algunos casos la planta puede ser resistente a la virulencia de una raza del patógeno y susceptible a otra (Agrios, 1997). Está controlada por uno o pocos genes (genes mayores) que actúan de manera más efectiva en el reconocimiento del patógeno generando inmunidad o una reproducción lenta del patógeno. Las variedades con resistencia vertical pueden mostrar una completa resistencia a un patógeno, pero son efectivas por un tiempo limitado ya que una o varias mutaciones en el patógeno pueden producir una nueva raza que puede infectar la variedad resistente previa. La combinación de genes mayores y menores para la resistencia contra el patógeno es lo más efectivo para crear una variedad de planta resistente (Agrios, 1997).

### 3.6. SITUACIÓN DEL TRIGO EN EL ECUADOR

En el Ecuador, junto con el arroz y la cebada, el trigo es el cereal de mayor importancia, ya que su grano es utilizado para fabricar una gran variedad de productos alimenticios. El consumo nacional supera las 450.000 TM/año, resultando en un consumo *per capita* superior a 30kg/año (SICA, 2002). Para satisfacer la demanda local, el Ecuador importa el 98% de los requerimientos internos de trigo y tan solo produce el 2% (9000 TM) a nivel local (INIAP, 2009). Adicionalmente, el Ecuador registra la productividad más baja en Latinoamérica con 0.6 TM/ha, y con mayor dependencia en importaciones del mercado internacional del trigo (El Mercurio, 2011). El Ecuador ha gastado aproximadamente 225'000.000 USD/año por la importación de este cereal. Según organismos especializados, el precio internacional del trigo se conservará alto, lo que determina que la importación del trigo ya no sería rentable (INIAP, 2009).

Conscientes de las deficiencias en la producción, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y el Gobierno Nacional iniciaron un proyecto para recuperar la superficie cultivada del trigo a 50.000 hectáreas, poniendo como meta producir 2 toneladas promedio y reducir las importaciones a un 30% (Agrytec, 2010). Para lograr este objetivo es necesario utilizar variedades de trigo con un desempeño superior al de las variedades vigentes. La estabilidad de rendimiento depende de la mejora genética que de sustento al futuro productivo de este cultivo y en gran parte de la resistencia a las enfermedades (INIAP, 2009), y entre ellas el aumento en la resistencia a la roya amarilla (*P. striiformis* f. sp *tritici*). La siembra de cultivares resistentes es el método más efectivo, económico y ambientalmente amistoso para el control de la roya en trigo (Wan & Chen, 2012), por lo que la selección de

fuentes de resistencia eficientes para la roya amarilla se debe basar en un proceso sistemático, en el que se identifiquen con claridad los diferentes tipos de resistencia disponibles. Para lograr esto es indispensable conocer la diversidad genética de las poblaciones de roya, relacionada a su virulencia en el trigo, para poder desarrollar programas de mejoramiento efectivos contra las poblaciones locales del patógeno.

En el Ecuador, las variedades comerciales del trigo no tienen niveles adecuados de resistencia para la roya amarilla, ya que el patógeno ha desarrollado virulencia para todos los factores de resistencia utilizados en el programa de mejoramiento del INIAP (Ochoa, 2003). Esto se debe a que la roya amarilla puede cambiar rápidamente en virulencia (Wan & Chen, 2012), por su alta adaptabilidad a nuevos factores de resistencia en el hospedero, producida por mutaciones o recombinaciones somáticas del hongo (Ochoa, 2003). Conjuntamente con estos fenómenos, la variabilidad de genotipos del trigo cultivados, así como las condiciones climáticas adecuadas, han creado condiciones favorables para una rápida y flexible evolución del patógeno hacia nuevas razas fisiológicas con nuevos genes de virulencia (Ochoa, 2003). Estos cambios pueden dejar sin efecto la resistencia de los cultivares, dando como resultado epidemias severas (Wan & Chen, 2012). Además, las royas se reproducen rápidamente y pueden moverse distancias muy grandes con ayuda del viento (Florencia *et al.*, 2009), infectando otras especies de poaceas de cultivos cereales y/o hierbas. Algunos estudios sugieren que *P. striiformis* puede naturalmente o artificialmente infectar hasta 320 especies de hierbas clasificadas en 50 géneros de la familia Poaceae, produciendo en algunos casos síntomas idénticos a los de plantas de trigo infectadas. Los géneros más susceptibles son *Aegilops*, *Agropyron*, *Bromus*, *Elymus*, *Hordeum*, *Secale* y *Triticum* (Hovmøller *et al.*, 2011). Cuando existe ausencia del cultivo de trigo, la roya podría mantener sus poblaciones activas



en estos hospederos susceptibles cercanos al área de cultivo, y subsecuentemente la población podría volver a restablecerse por migración hacia nuevos cultivos de trigo, cuando se encuentren presentes (Hovmøller *et al.*, 2011).

El presente estudio pretende contribuir al conocimiento de la diversidad genética del género *Puccinia* que infecta al trigo y otros pastos de la familia Poaceae en el Ecuador, a partir de la identificación molecular de especies de *Puccinia* presentes en pastos silvestres de la zona andina, y además del análisis de la virulencia y de variabilidad genética a partir del uso de microsatélites (SSR) en *P. striiformis* f. sp. *tritici* proveniente de campos de trigo de la sierra ecuatoriana. Además, se relacionarán filogenéticamente todas las especies de *Puccinia* identificadas. La información obtenida servirá para documentar la presencia de las diferentes especies de roya en pastos en el Ecuador y para determinar la composición genética de *P. striiformis* f. sp. *tritici* en el trigo. Estos últimos datos son indispensables para seleccionar variedades de trigo que posean factores de resistencia efectivos contra las poblaciones locales de roya amarilla presentes en el Ecuador.

### **3.7. OBJETIVOS**

#### **3.7.1. OBJETIVO GENERAL:**

Realizar un estudio preliminar de la diversidad genética del género *Puccinia* en hospederos de la familia Poaceae en el Ecuador.

### 3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar muestras de *Puccinia* sp. provenientes de especies de Poaceae de la zona andina del Ecuador mediante la secuenciación de la región ITS1 e ITS-2 del ADN ribosomal del hongo.
- Determinar la relación filogenética entre todas las especies de *Puccinia* identificadas en el estudio y con especies identificadas a nivel mundial
- Determinar la diversidad genética de *P. striiformis* f. sp *tritici* proveniente de trigo de la colección de roya amarilla del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y de muestras colectadas en la hacienda Aychapicho en Aloag, Ecuador, mediante el uso de microsatélites y pruebas de virulencia.
- Comparar la diversidad genética de las muestras de *P. striiformis* f. sp *tritici* ecuatorianas con la diversidad reportada para la roya amarilla de otros países.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DEL GÉNERO

#### ***PUCCINIA* EN POACEAE Y TRIGO:**

Se recolectaron muestras de roya en Poaceae en 5 provincias y 13 localidades del Ecuador, que poseen páramos o bosques siempreverde montano alto, con condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad (Vásconez, 2001). Cada muestra consistía de una o más hojas del hospedero que presentaban pústulas con esporas. Se tomaron los datos de ubicación de cada muestra con ayuda de un GPS (Global Positioning System). Las hojas infectadas fueron secadas y almacenadas en sobres dentro de fundas plásticas *Ziploc* que incluía un paquete de sílica gel, y se mantuvieron a 4°C para su conservación.

Para el estudio de diversidad del género *Puccinia* en Poaceae, se obtuvieron un total de 69 muestras de diferentes especies de hierbas provenientes de las provincias de Bolívar, Carchi, Napo, Pichincha y Tungurahua (Tabla 1): 9 se colectaron en Salinas de Guaranda, en Bolívar; 8 en el Páramo del Ángel, Carchi; 8 en el Páramo de la Virgen y 9 en los alrededores de las Termas de Papallacta, Napo; 29 muestras provenían del Parque Metropolitano de Quito, 3 de Guayllabamba y 1 de la ciudad de Quito, en Pichincha; y 2 provenían de Baños, en Tungurahua. La recolección se realizó en época invernal entre los meses de Octubre del 2012 a Enero del 2013.

Para el estudio de diversidad de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) se colectaron un total de 9 muestras provenientes de las provincias de Carchi, Chimborazo y Pichincha: de las cuales 3 muestras se colectaron en la hacienda Aychapicho (Holding Dine, S.A), en Pichincha y 6 muestras pertenecían a la colección del

INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) (1 de la hacienda Yarahurco y 2 de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, en Pichincha; 2 colectadas en la Paz, en Carchi y 1 en la Granja Totorillas en Chimborazo) (Tabla 2). La recolección se realizó entre los meses de Junio a Septiembre del 2011 antes de la época de cosecha del trigo.

#### **4.2. IDENTIFICACIÓN DEL HOSPEDERO:**

El género de los hospederos de las muestras colectadas de Poaceae fue identificado a partir de sus características florales, con ayuda de un estereoscopio, equipo de disección y la guía de campo: Flora genérica de los páramos (Sklenář *et al.*, 2005). En casos en los cuales la identificación con características morfológicas no fue posible, se utilizó identificación a nivel molecular a partir de la región ITS del ADN ribosomal utilizando los cebadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') diseñados por White *et al.* 1990. (Tabla 3), los cuales pueden amplificar ADN de organismos que incluyen además de los hongos, plantas, protistas y animales (Gardes & Bruns, 1993). La metodología utilizada fue la misma para la identificación de las especies de roya que se describe más adelante. Para la extracción del ADN de la planta se evitó tomar áreas de tejido de la hoja infectadas con roya o cualquier otro tipo de organismo.

#### **4.3. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS-1 E ITS-2 DEL ADN RIBOSOMAL**

Para la extracción del ADN de las royas así como de sus hospederos, se utilizó un protocolo estándar para la extracción de ADN con Tiocianato de Guanidina descrito en el

Anexo 2. Una vez extraído el ADN, se determinó la calidad y la concentración del ADN de cada muestra utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Se realizaron diluciones del ADN a 20ng/μL con agua Milli-Q necesarias para la reacción de PCR.

La identificación de las especies de roya se realizó analizando las secuencias de la región de ITS del ADN ribosomal del hongo. Esta es un área no codificante que se encuentra entre las regiones de los genes altamente conservados que codifican para las subunidades 18S, 5,8S y 28S del ribosoma. La región ITS es ampliamente utilizada en la taxonomía de hongos, debido a que es altamente variable entre especies morfológicamente distintas, y la variación intraespecífica es baja (Gardes & Bruns, 1993).

Se utilizaron los cebadores ITS1, ITS1-F (específico para basidiomicetos) (Gardes & Bruns, 1993), e ITS-4, ITS4-BR e ITS4-BR2, los dos últimos específicos para royas (Vialle *et al.*, 2009). Las secuencias de los cebadores y las combinaciones utilizadas en la amplificación del ADN se describen en las Tablas 3 y 4. Se trabajó con una reacción de PCR con un volumen final de 25μl, para la cual se combinó: 1μL de ADN (20ng/μl) de la muestra a analizarse, 18,25μL de agua Milli-Q, 1X PCR Buffer (Invitrogen), 3mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.2mM de dNTPs (Invitrogen), 0,2μM de cada cebador y 0,1U/μL de Taq polimerasa (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Multigene Labnet), con el siguiente perfil de temperaturas: para la desnaturalización inicial se utilizó 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 50°C o 54°C durante 30 segundos para el alineamiento, dependiendo de la combinación de los cebadores utilizados (Tabla 4) y 72°C por 1 minuto (extensión); finalmente, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos (extensión final) y 4°C infinito para la conservación de las muestras.

Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (AGAR-LE-500. AXYGEN Biosciences) en 0,5X de TBE p.H. 8.3 (Tris Borato EDTA), separados a partir de electroforesis durante 35 minutos, con un voltaje de 100 y un miliamperaje de 500, con una fuente de poder Enduro Power Supplies 300V (Labnet international Inc.). Los geles fueron teñidos por 10 a 15 minutos en una solución compuesta de 100ml de Buffer TBE 0,5X y 10 $\mu$ L de tinte SYBR Safe (DNA gel stain, Invitrogen.). Las bandas se visualizaron a través de un transiluminador (Safe Imager, Invitrogen), y cada resultado fue fotografiado. Las muestras que mostraban presencia de una banda de alrededor de 600pb se reportaban como positivas para ser secuenciadas, mientras que para las muestras que no presentaban bandas se realizó otra PCR, en la cual se utilizaron otras combinaciones de cebadores (Tabla 4). Las muestras positivas fueron enviadas a la compañía Macrogen (Seúl, Korea) para su secuenciamiento, previo a un tratamiento con la enzima Exosap IT (USB Corporation) al 20%, para la degradación de residuos de cebadores y nucleótidos.

#### **4.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

Las 46 secuencias de la región ITS obtenidas se editaron con el programa Geneious 5.4.6 (Bio Matters Ltd. Copyright © 2005-2012). Se obtuvieron secuencias consenso de aproximadamente 685 pb que incluían la región ITS-1, 5.8S, e ITS-2 del ADNr. Se confirmó el género y especie de las muestras a partir de la comparación con secuencias disponibles en GenBank a través del programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (NCBI, 2013). El porcentaje de máxima identidad para designar especies fue sobre el 98%. Varias secuencias de los grupos principales de royas en pastos disponibles en GenBank se utilizaron para los análisis filogenéticos. El árbol filogenético se construyó en base al criterio de Máxima

verosimilitud, el cual selecciona el árbol que posee la mayor probabilidad para explicar los cambios nucleotídicos que se observan entre las diferentes secuencias analizadas (Freeman & Herron, 2004). El modelo utilizado para especificar el cambio evolutivo entre las distintas secuencias fue escogido a partir del programa JModel Test 2.0.2, y el árbol fue construido en Geneious 5.4.6, bajo el modelo de Substitución de *Custom* (010212), con un *bootstrap* de 100 réplicas. Se utilizó como grupo externo a *Uromyces transversalis* del hospedero *Gladiolus* sp.

#### **4.5. OBTENCIÓN DE MONOSPÓRICOS Y MULTIPLICACIÓN DE ESPORAS:**

Para los análisis de virulencia y microsatélites de las 9 muestras ecuatorianas de *P. striiformis* f. sp. *tritici* de trigo, fue necesario primeramente obtener cepas del hongo procedentes de una sola espora o pústula (monospóricos) para asegurar que se está trabajando con un solo individuo y no con una mezcla de esporas de diferentes individuos. Para este proceso se utilizaron plantas de trigo de la variedad susceptible Morocco como hospederos de las cepas obtenidas en el campo. La siembra y manutención de las plantas de trigo fue realizada en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

Se sembraron de 10 a 20 semillas del hospedero en macetas individuales que contenían sustrato compuesto de tierra esterilizada con irradiación solar, salvado de trigo y Pomina. Las macetas se colocaron en bandejas con agua durante 10 días, o hasta que se producía el brote de las 2 primeras hojas (Anexo 3, Foto 3), momento en el cual las plantas se encontraban listas para la inoculación de las esporas de la roya amarilla. Previo a la inoculación, las esporas fueron rehidratadas, para lo cual se recortó con una tijera un pedazo de hoja infectada de cada aislamiento y se la colocó en una caja Petri, cada caja Petri se guardó dentro de una tarrina

plástica con 20 ml de agua, y esta a su vez se ubicó dentro de una funda plástica. Esta cámara húmeda se mantuvo en la oscuridad durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo, con un cotonete previamente humedecido en aceite mineral, se frotó suavemente cada hoja infectada con pústulas de roya amarilla y estas se inocularon frotando el haz de una hoja sana de Morocco (Anexo 3, Foto 4). Se etiquetó cada maceta con el número de la muestra inoculada y se trasladaron las plantas al exterior, durante un período de 10 a 15 minutos para que las hojas se sequen y las esporas se adhieran a la superficie de la planta. Finalmente, se aisló cada maceta dentro de una cámara de plástico individual con tapa, para evitar contaminaciones entre otras cepas del hongo (Anexo 3, Foto 5). Se colocaron las macetas dentro de una bandeja con 2 litros de agua, durante 36 horas. Este último proceso permitió la evaporación del agua dentro de la cámara, formando un ambiente húmedo ideal para la germinación de las esporas. Transcurridas las 36 horas, se retiró la tapa de las cámaras aislantes y se trasladó cada maceta a un cuarto temperado a 14°C (Anexo 3, Foto 6), donde reposaban en bandejas con agua y fertilizante diluido (Rancho Alegre: compuesto de Microelementos elementales, además de 12% de nitrógeno + 12 % de Fósforo + 17 % de Potasio y 2 % de Magnesio). Las plantas se mantuvieron hidratadas y fertilizadas semanalmente. Las hojas no infectadas fueron podadas para facilitar la recolección futura de las esporas.

Diez días después de la inoculación, se pudo observar las primeras pústulas con esporas de roya amarilla, que aparecían en forma de puntos anaranjados en el haz de las hojas de las plantas de trigo (Anexo 3, Foto 7). Con ayuda de un cotonete remojado en aceite mineral, se tocó una sola pústula para que las esporas se adhiriesen. Después, se inoculó una hoja de un hospedero nuevo, y se repitió el mismo proceso descrito anteriormente 3 veces por cada cepa hasta obtener el tercer monospórico, para asegurar la pureza genética del individuo.



Una vez obtenidos los monospóricos, las plantas infectadas se mantuvieron dentro de las cámaras de aislamiento para producir esporas. Cada 48 horas, se insertaba un tubo de colección que rodeaba a las hojas infectadas de cada cepa y se daban pequeños golpes, los cuales removían las esporas del haz de la hoja que caían directamente dentro del tubo (Anexo 3, Foto 8). La recolección de cada cepa se realizó hasta que el hongo dejase de producir esporas. Una vez obtenidas las esporas, se selló la boca de cada tubo con un pedazo de algodón, se etiquetó y se almacenó en una cámara con sílica gel, para secar las esporas y evitar su germinación.

Después de obtener el tercer monospórico de cada cepa se procedió a la multiplicación de las esporas. Para este proceso se tomó aproximadamente 0.5gr de esporas de cada muestra y se colocó en un frasco que contenía 5ml de aceite mineral. Con ayuda de un soplador previamente esterilizado, se procedió a esparcir la solución en las hojas de la variedad Morocco y se siguió el mismo procedimiento de incubación en una cámara húmeda, la manutención a 14°C y la recolección de esporas descrito anteriormente.

#### **4.6. PRUEBAS DE VIRULENCIA**

La roya del trigo se cataloga en razas en base a su capacidad de infectar (virulencia) o no (avirulencia) cultivares o genotipos del trigo que poseen un solo gen de resistencia, referidos como diferenciales (Chen, 2005). Para identificar las razas de las muestras de *P. striiformis* f.sp. *tritici* colectadas se realizaron pruebas de virulencia en la Universidad de Washington State (WSU), Laboratorio de Fitopatología en Estados Unidos.

Se utilizaron 20 plantas diferenciales cada una con uno de los siguientes genes de resistencia efectivos contra *P. striiformis* f. sp. *tritici*: Yr1, Yr5, Yr6, Yr7, Yr8, Yr9, Yr10,

Yr15, Yr17, Yr24, Yr27, Yr32, Yr43, Yr44, YrSP, YrTr1, YrExp2, YrTye y Yr26 (Chen *et al.* 2010). Se utilizó como control positivo una línea con 0 genes de resistencia (Tabla 5).

Los diferenciales se sembraron en macetas con un sustrato que consistía de una mezcla de 6 galones de turba, 3 galones de arena, 2 galones de perlita, 3 galones de tierra preparada, 4 galones de vermiculita, 1 taza de Osmocote (abono) y 2 galones de agua. Se sembraron 5 semillas de cada diferencial con 5 diferenciales por maceta. En la primera maceta, se encontraban los diferenciales Yr1, Yr5, Yr6, Yr7 y Yr8; en la segunda maceta Yr9, Yr10, Yr15, Yr17 y Yr24; en la tercera, Yr27, Yr32, Yr43, Yr44 y YrSP; y en la cuarta, YrTr1, YrExp2, YrTye, Yr26 y el control positivo (Anexo 4 y Anexo 5, Foto 9). Aproximadamente, a los 10 días de la siembra, las plantas se encontraban en el estadio de 2 hojas listas para la inoculación. Para esto, sobre papel encerado se mezcló 1gr de esporas y 4gr de talco estéril (Fisher Scientific) por cada monospórico por separado (Anexo 5, Foto 10 y 11). Se roció con agua estéril a los 20 diferenciales y con un cotonete se tomó una porción de esta mezcla de esporas y se espolvoreó uniformemente sobre las hojas de cada diferencial y se las roció nuevamente con agua (Anexo 5, Foto 12 y 13). Las macetas fueron colocadas dentro de una cámara de aislamiento y trasladadas a la cámara húmeda, donde se incubaron en la oscuridad a 10°C durante 24 horas (Anexo 5, Foto 14) (Chen, 2010). Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento temperado bajo condiciones ambientales específicas descritas por Chen *et al.* (1992) hasta el momento en el cual se evaluaron las reacciones de la infección (Anexo 5, Foto 15). A los 20 días después de la inoculación (Anexo 5, Foto 16) se realizó la lectura de virulencia utilizando una escala del 0 al 9 (Line, 1992) que se describe en los Anexos 6 y 7. La virulencia de las cepas ecuatorianas fue comparada con la virulencia de 2 cepas estadounidenses Pst-35 (virulenta para los genes 6,7,8,9,17,43,44,Tr1,Exp2 y avirulenta

para 1,5,10,15,24,27,32,SP,Tye) y Pst-37 (virulenta para 6,7,8,9,17,27,43,44,Tr1,Exp2 y avirulenta para 1,5,10,15,24,32,SP,Tye) provenientes de la colección de WSU.

#### 4.7. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA CON MICROSATÉLITES

Para la extracción del ADN de las cepas de *P. striiformis* f.sp. *tritici*, se utilizó el protocolo de extracción de ADN para royas, utilizado por el laboratorio de Fitopatología en WSU descrito en el Anexo 8. La cuantificación del ADN de cada muestra se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y se realizaron diluciones de cada muestra a 25ng/μL de ADN en 200μL de agua para cada cepa.

Se amplificaron 14 loci a partir de cebadores específicos para microsatélites (SSR) *P. striiformis* f. sp. *tritici* desarrollados por Chen, *et al* (2009): PstP001, PstP002, PstP003, PstP004, PstP005, PstP007, PstP008, PstP0021, PstP025, PstP028, PstP029, PstP030, PstP031 y PstP033, cuyas características se describen en la Tabla 6. En la reacción de PCR se utilizó 2μL de ADN genómico de cada cepa (25ng/μl), 6,78μL de agua Milli-Q, 1X PCR Buffer, 3,3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6mM de dNTPs, 0,4μM de cada cebador y 0,04U/μL de Taq polimerasa. Se incluyó además 4 cepas de Estados Unidos como control, Pst-35, Pst-37, Pst-78 y Pst-127 provenientes de la colección del laboratorio de Fitopatología de WSU.

La amplificación se realizó bajo el siguiente régimen de temperaturas: para la desnaturalización inicial se utilizó 1 ciclo de 94°C durante 5 minutos; luego 10 ciclos en "touchdown": 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 60-50°C por 45 segundos en donde se produjo la disminución de 1°C por cada ciclo (alineación), 72°C por 90 segundos (extensión); 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 50°C por 45 segundos (alineación) y 72°C por 90 segundos (extensión); 1 ciclo de 72°C por 7 minutos (extensión)

final); y 15°C para la conservación de las muestras. Para comprobar la presencia del ADN amplificado, se realizó electroforesis en agarosa al 1% y se tiñeron los geles durante 10 minutos en una solución compuesta 5µl de bromuro de etidio en 100ml de TBE 1X. Finalmente, se tiño 4µl del producto de PCR con 1µl de Buffer de Formamida para carga (98% Formamida, 10mMEDTA pH 8.0, Azul de Bromofenol 0.5% (w/v), Xylene Cyanol 0.5% /w/v)).

Se realizaron tres métodos distintos para la separación de los alelos: en el primero se empleó el protocolo desarrollado en el laboratorio de Fitopatología de WSU para la cámara para geles de poliacrilamida DDH-400-33 C.B.S. SCIENTIFIC CO. detallado en el Anexo 9; el segundo protocolo fue desarrollado por Benbouza *et al.* (2006) para la cámara de geles de poliacrilamida Sequi-Gen GT Sequencing Cell de BIO-RAD, el cual se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador que se detalla en el Anexo 10; y el tercero fue realizado por el laboratorio del Eastern Cereal Oilseed Research Center, Agriculture and Agri-Food Canadá, empleando el método de ABI que utiliza electroforesis por capilaridad a través de un analizador genético ABI3130xl.

#### **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Una vez determinados los alelos para cada uno de los 14 loci, se utilizó el programa GenAlexV.6.41 (Peakall & Smouse, 2006) para calcular las frecuencias alélicas, el número de alelos, el número de alelos diferentes y el número efectivo de alelos. A partir de estos datos se calculó la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), y el índice de fijación ( $F_{IS}$ ) que calcula la desviación de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a las esperadas para una población con apareamiento al azar. Además se calculó el desequilibrio de ligación

( $r^2$ ), que mide el grado en el que los alelos de 2 loci se encuentran asociados. Este último fue estimado a partir del programa Popgene V1.32 (Yeh *et al.*, 2000). Debido al tamaño pequeño de la muestra no se analizó el Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) para la población, ni el análisis de AMOVA o diferencia genética entre poblaciones. Para medir la diversidad de los microsatélites, se calculó el índice de Shannon (I). Se obtuvieron matrices de distancias genéticas basadas en las diferencias entre todos los pares de alelos de los microsatélites y también para las diferencias de virulencia entre las cepas. Estas matrices se utilizaron para realizar un análisis de coordenadas principales por separado para los microsatélites y para la virulencia, para visualizar los patrones de relación genética entre las muestras, en base a las distancias genéticas calculadas. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Mantel entre los genotipos de microsatélites con los fenotipos de virulencia, en base a las matrices de distancias genéticas de cada uno para determinar si existía correlación entre las razas observadas y los haplotipos en base a microsatélites.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS HOSPEDEROS POR GÉNERO

En base a las estructuras florales y, cuando fue necesaria la secuenciación de la región ITS, se identificaron 8 géneros de la familia Poaceae a partir de 54 muestras: 4 de *Agrostis*, 15 de *Anthoxanthum*, 3 de *Bromus*, 1 de *Dactylis*, 28 de *Holcus*, 1 de *Nasella*, 1 de *Sporobolus* y 1 de *Paspalum*. Adicionalmente se recolectaron 5 muestras de roya, 3 de la familia Berberidaceae y 1 en cada hospedero de Juncaceae y Crocoideae. De las 69 muestras obtenidas, solamente 59 pudieron ser identificadas (Tabla 1 y 7).

### 5.2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ROYAS POR HOSPEDERO

Se identificaron 7 especies de 3 géneros diferentes de royas de 47 muestras colectadas. Las especies fueron: *Puccinia holcina*, *P. coronata*, *P. graminis*, *Edythea quitensis*, *Uromyces transversalis* y *U. penkanus*. Para 11 muestras que solamente se logró determinar el género, 10 pertenecían a *Puccinia* y 1 a *Uromyces*. Para las 22 muestras restantes a pesar de haber utilizado varios tipos de combinaciones de cebadores para la región ITS no hubo amplificación.

Cada especie de roya se encontró en uno o varios hospederos: *P. holcina* fue encontrada en *Holcus lanatus* y 1 especie no identificada; *P. coronata* en *H. lanatus*, y dos especies no identificadas; *P. striiformis* fue hallada en *Anthoxanthum* sp., *Bromus catharticus*, *Dactylis glomerata* y *H. lanatus*; *P. graminis* en *Anthoxanthum*; *Puccinia* sp. en *Agrostis*, *Anthoxanthum*, *Bromus* sp., *H. lanatus*, *Sporobolus* sp. y en un hospedero no identificado; *E.*

*quitensis* se encontró en *Paspalum* sp., *Berberis hallii*, *B. grandiflora*, *Berberis* cf. *pichinchensis* y en *Luzula* sp.; y *U. transversalis* y *U. pencaus* se encontraron en *Gladiolus* sp. y *Nasella* sp. respectivamente (Tabla 7).

### 5.3. FILOGENIA

El árbol filogenético resultante del análisis de máxima verosimilitud presenta 13 clados: 6 clados que agrupan a las diferentes especies de *Puccinia* (*P. coronata*, *P. striiformis sensu lato*, *P. persistens*, *P. triticina*, *P. holcina* y *P. graminis*), otros 5 clados con muestras del género *Puccinia* pero sin especie identificada, un clado que incluye a *Edythea quitensis*, y un clado del género *Uromyces* sp. utilizado como grupo externo (Figura 1).

El clado que comprende la especie *P. coronata* tiene un soporte de *bootstrap* del 92%, y cuenta con 2 grupos, el primero que incluye a todas las muestras de diferentes localidades ecuatorianas que tiene como hospedero a *Holcus lanatus* (PSG-5, PPM-7, PPM-10, PPM-13, PPM-26, PPM-27, PG-2, PPV-6, PP-3, PP-4 y PPA-6) y que coinciden con la cepa HSZ0977 colectada de *Holcus* proveniente de Estados Unidos; y el segundo con muestras que tienen como hospedero al género *Avena* sp. y *Rhamus* sp. provenientes de diferentes países (Suecia, Panamá e Irán) y la cepa ecuatoriana PP-1 de hospedero desconocido. La cepa PSG-5 sin identificar también se encuentra incluida dentro del clado de *P. coronata*.

El clado de *P. persistens* y *P. triticina* incluye las cepas de Irán 11513 y 11511 y de Estados Unidos HSZ0741 y RN-22, respectivamente, con un soporte del 100%. Ninguna muestra ecuatoriana se ubicó en este clado.

Para el grupo de *P. holcina*, se obtuvo un soporte del 100%, e incluye muestras encontradas en el hospedero *Holcus lanatus*, contiene a las cepas de la provincia de Pichincha

PPM-1, PPM-2, PPM-8, PPM-11, PPM-12, PPM-22 PPM-23 y PQ-1; 2 cepas de la provincia del Carchi PPA-1, PPA-2; y las cepas estadounidenses HSZ0891 y HSZ0741. Además, incluye una cepa de la provincia de Napo PP-8 de hospedero desconocido.

El grupo de *P. graminis*, con un soporte del 99%, posee 2 grupos: el primero comprende de las muestras de la tribu Aveneae, PPM-15 y PPM-17 y PPM-19 del género *Anthoxanthum* y dos muestras Iraníes (105, RN-20) provenientes de *Avena sativa*; y el segundo grupo está compuesto de las muestras provenientes de la tribu Triticeae: R204 de Bélgica, 70MEX3A de Estados Unidos, SC de Irán y una muestra de Alemania. Ninguna muestra ecuatoriana se ubicó en este grupo.

El clado del grupo de *Edythea quitensis*, tiene un soporte del 98%, y se divide en 2 grupos, el primero incluye a la cepa BP-1 del hospedero *Berberis* cf. *pichinchensis* colectada en Napo a 3500msnm y a PB-1 del hospedero *Paspalum* sp colectada en Tungurahua a 1815msnm.; el segundo incluye a la cepa de la familia Juncaceae JPA-1 y las muestras de la familia Berberidaceae BPA-1, y BPM-1 (*B. grandiflora* y *B. hallii* respectivamente), las dos primeras colectadas en la provincia del Carchi y la última en la provincia de Pichincha.

Para el grupo de *P. striiformis sensu lato*, se obtuvo un soporte del 88%, y está formado por 4 subclados: 1) *P. pseudostriiformis*, con un soporte del 89%, incluye a las cepas del hospedero de la tribu Poae de Irán 11500 y HSZ0010 de Estados Unidos; 2) *P. striiformoides*, con un soporte del 58%, comprende las muestras que provienen de la tribu Poae que incluye a una cepa japonesa (JPN), una cepa ecuatoriana PSG-9, y una estadounidense HSZ0699, además de 3 muestras ecuatorianas pertenecientes al hospedero de la tribu Aveneae (PPM-14, PP-5 y PP-7); 3) *P. striiformis*, con un soporte del 88%, incluye a la cepa PG-3 del hospedero *Bromus*, a las cepas de la tribu Triticeae de Ecuador Pst-5, Pst-2 y



Pst-4 (del presente estudio), estadounidenses 22/99 y PSH13, y de China B2011-4; Finalmente, *P. gansensis* (DAON 240065) que no se agrupa con ninguna muestra ecuatoriana.

Se encontraron 3 grupos de *Puccinia* sp., que no se logró identificar la especie, pero sus hospederos pertenecen a la tribu Aveneae: el primero comprende únicamente a PPV-04; el segundo a la cepa PSG-08, y el tercero tiene un soporte del 66%, y está compuesto de las muestras PSG-6, PPV-5, PPV-3 y PP-4. Por otro lado, se encontró 2 grupos que comprenden hospederos de 2 tribus diferentes: el primero pertenece a la tribu Bromeae, y comprende las cepas PPV-1, PPV-2, y PSG-7 (con hospedero no identificado), y el segundo comprende la tribu Eragrostoideae con la cepa PG-1.

El género *Uromyces* sp. incluye a las especies *U. transversalis* FL11-1 estadounidense utilizado como grupo externo, y PB-2 ecuatoriana, de *Gladiolus* sp. y a *U. pencanus* PPM-28 de la tribu Stipeae.

#### 5.4. PRUEBAS DE VIRULENCIA

Se encontraron 8 razas diferentes en las 9 muestras de *P. striiformis* f. sp. *tritici* analizadas para 20 genes de resistencia. Los niveles y la frecuencia de virulencia observada de cada cepa de roya amarilla, así como la descripción de las razas se presentan en la Tabla 8 y en la Figura 2. La gran mayoría de cepas, a excepción de Ec-5 y Ec-6, fueron virulentas para más de 10 genes de resistencia, siendo las muestras más virulentas Ec-3, Ec-7 y Ec-9 que pudieron infectar hasta 17 de los 20 diferenciales de trigo. Todas las cepas de roya amarilla fueron virulentas en los diferenciales Yr1, Yr9, Yr27 y YrTyee. Por otro lado, 8 de las 9 cepas resultaron virulentas para los genes Yr6, Yr7 y Yr17; 7 cepas fueron virulentas para Yr8 y Yr44; 6 cepas fueron virulentas en los diferenciales Yrtri y YrExp<sup>2</sup>; 5 cepas para el gen Yr43;

4 cepas resultaron virulentas para Yr10, Yr24, Yr32 y Yr26; y únicamente una cepa fue virulenta para el gen YrSP. Finalmente, ninguna de las cepas fue virulenta para los genes Yr5 y Yr15.

Tres razas encontradas pudieron ser identificadas utilizando como referencia los códigos para la caracterización de razas previamente descritos por Wan & Chen, 2012 (Unpublished data), en donde las muestras Ec-3 y Ec-9 pertenecen a la Raza Pstv-49, Ec-1 a la raza Pstv-14 y Ec-2 a la Raza Pstv-11. Por otro lado, las 5 cepas restantes presentaron patrones de virulencia no reportados anteriormente por esos autores.

La matriz de los resultados del análisis de distancias genéticas se presenta en la Tabla 9. A partir de estos datos se realizó el análisis de coordenadas principales (Figura 3). Tres grupos se pueden distinguir a partir de la semejanza de virulencias entre las muestras analizadas: el primero compuesto por las cepas Ec-3 y Ec-9 con igual virulencia, y área de colecta (Cantón Mejía del INIAP, Pichincha), y Ec-7 colectado en el cantón Montúfar, Carchi y Ec-8 colectado en la Hacienda Aychapicho, Pichincha en la variedad del trigo Cojitambo; el segundo grupo comprende las muestras Ec-6 con Ec-5 ambas fueron colectadas en la variedad de trigo Cojitambo en la cual hacienda Aychapicho, Pichincha; finalmente, el tercer grupo compuesto por las cepas Ec-1 colectado en la provincia del Pichincha, en la variedad de trigo Vivar, la cepa Ec-2 colectada en la provincia del Carchi, la cepa Ec-4 colectada en la provincia de Chimborazo, y las 2 muestras provenientes de Estados Unidos Pst-35 y Pst-37.

## **5.5. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA CON MICROSATÉLITES**

De los 3 métodos utilizados para el análisis de microsatélites, se pudo constatar que para los cebadores utilizados el mejor procedimiento fue el método de ABI que emplea

electroforesis por capilaridad. Los otros 2 procedimientos en geles de poliacrilamida, mostraron poca o ninguna amplificación, debido a que el tipo de cebadores utilizados fue diseñado para la técnica de ABI. Los resultados que se presentan a continuación corresponden al método ABI.

Se encontraron de 1 a 3 alelos por locus en las 12 muestras de *P. striiformis* f. sp. *tritici* analizadas (9 ecuatorianas y 3 extranjeras) para los 14 loci (Tabla 10). El tamaño de los alelos para cada locus fue el siguiente: PstP001 (330, 336, 339 pb), PstP002 (337, 343, 346 pb), Pst003 (202, 218pb), Pst004 (470, 473, 476pb), Pst005 (294, 300 pb), Pst007 (268, 295 pb), PstP008 (426, 429 pb), Pst021 (174pb), Pst025 (337, 357 pb), PstP034 (185, 187 pb), Pst028 (461pb), Pst029 (168, 171, 174pb), Pst031 (257pb) y PstP033 (404, 418, 422pb). La frecuencia de cada alelo se detalla en la Tabla 10.

El promedio de los índices estadísticos de todos los loci analizados muestra que la heterocigosidad observada ( $H_o = 0,362$ ) es mayor a la esperada ( $H_e = 0,317$ ), lo que está corroborado por el índice de fijación ( $F_{IS}$ ) que tiene un valor negativo de  $-0,151$  (Tabla 11). El desequilibrio de ligamiento ( $r^2$ ) muestra un valor de  $0,731$ , con un nivel de significancia de  $0.02$  que indica que los loci se encuentran en desequilibrio de ligamiento, y que esto no se produce al azar. Adicionalmente, el índice de Shannon ( $I = 0,517$ ) indica que la riqueza genética entre las muestras es relativamente alta. En la Tabla 12 (matriz de distancias genéticas), y en la Figura 4 (gráfica del análisis de coordenadas principales) se observa los patrones de relación genética entre todas las muestras analizadas. Para las cepas de la provincia del Pichincha Ec-3, Ec-5, Ec-6, Ec-8, y Ec-9, se observó que estas eran semejantes al agruparse cercanamente. Por otro lado, las muestras Ec-7 del Carchi y Ec-8 de Pichincha son genéticamente iguales a pesar de haberse recolectado en provincias diferentes. También se

observó semejanza entre las cepas Ec-2, Ec-4, Pst-35 y Pst-37, mientras que la cepa Pst-127 es la más lejana a todas. Los dos primeros ejes explicaron el 67,32% de la variación.

En el análisis de Mantel donde se compararon las distancias genéticas de virulencia con la de microsatélites, dio un valor de  $R^2 = 0,1331$ , lo que indica baja correlación entre estas dos características de *P. striiformis* f. sp. *tritici*.

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 6.1. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE ROYAS DEL GÉNERO *PUCCINIA* EN POACEAE:

El presente estudio confirma que existe una alta diversidad de royas que parasitan gramíneas en la región andina del Ecuador. De los 11 hospederos identificados (9 en Poaceae y 3 en Berberidaceae, Crocoideae y Juncaceae) se encontraron 8 especies diferentes de royas, además de 9 cepas que podrían pertenecer a especies nuevas.

Los resultados obtenidos en este trabajo con relación al análisis filogenético, coinciden con aquellos publicados por diferentes autores para royas (Hambleton *et al.*, 2012; Abbasi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010). En el caso de *P. coronata*, esta especie parasita cultivos de avena y también a un amplio rango de otras gramíneas. La especie se encuentra dividida en dos variedades: *P. coronata* var. *coronata* y *P. coronata* var. *avenae*, esta última se subdivide a su vez en dos *formae specialis*: 1) *P. coronata* var. *avenae* f. sp. *avenae* que parasita a los hospederos del género *Avena*, *Dactylis*, *Hordeum*, *Festuca*, *Glyceria*, *Lolium*, *Phalaris*, *Poa* y *Schedonorus* y 2) *P. coronata* var. *avenae* f. sp. *graminicola* que parasita a los hospederos *Arrhenatherum*, *Glyceria* y *Holcus* (Hambleton, 2012). En el presente estudio las cepas identificadas coinciden con la clasificación propuesta por Hambleton (2012). Todas las cepas de *P. coronata* forman parte de la variedad *avenae*, que incluye las cepas ecuatorianas (además de la cepa PPM-27 sin hospedero) y extranjeras que tienen como hospedero a *Holcus*, se ubican dentro de la f.sp. *graminicola*. Por otro lado, las cepas PP-1 y 3 cepas extranjeras se ubican dentro de la f.sp. *avenae*.

La especie *P. holcina*, es un grupo poco estudiado de royas debido a que no infecta gramíneas de importancia económica. Según el departamento de Agricultura de los Estados Unidos (<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm>) se ha reportado la infección de esta especie en 23 géneros diferentes de la familia Poaceae, incluida la especie *Holcus lanatus* en 16 países, en los cuales no se incluye al Ecuador. El presente estudio encontró en 3 provincias diferentes (Pichincha, Napo y Carchi) 11 muestras del hospedero *Holcus lanatus* y una con hospedero desconocido, infectados con la roya *P. holcina*, siendo el primer registro de esta roya en el Ecuador.

La especie de *P. graminis*, o también conocida como roya del tallo, tiene un amplio rango de hospederos que incluyen a algunas especies de la familia Berberidaceae como hospedero aecial y como hospedero telial a Poaceae. Presenta varias *formae speciales* (Abbasi, 2005). Los resultados obtenidos concuerdan con la agrupación que se observa en muestras a nivel mundial en que la especie se divide según los hospederos, Triticeae y Aveneae. En las colecciones realizadas en este estudio todas las muestras ecuatorianas parasitaban a la tribu Aveneae, pero no se encontraron muestras en Triticeae, probablemente porque las zonas muestreadas no presentan las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de *P. graminis* f.sp. *tritici*, que requieren de una temperatura entre 15 a 30°C (Roelfs, 1992), que es una temperatura superior a la promedio en los páramos.

El hospedero alternativo de *P. graminis* y recientemente también descrito de *P. striiformis* (Roelfs *et al.*, 1992 y Jin *et al.*, 2010), son especies del género *Berberis* cuya presencia pudiera permitir la reproducción sexual del hongo, y potencialmente la generación de una mayor variabilidad genética. Una consecuencia de este aumento en la variabilidad es que ocurran

poblaciones de roya con una mayor virulencia hacia hospederos teliales como el trigo. Esto pudiera traducirse en un mayor riesgo de pérdidas económicas al ser los cultivos susceptibles a estas nuevas razas de roya. Por esta razón, al encontrarse especies de *Berberis* infectadas durante las colecciones de roya, se tomaron muestras de este hospedero. La roya encontrada en *Berberis* se identificó como *Edythea quitensis* y no como roya del género *Puccinia*, por lo que este hospedero aparentemente no está actuando como hospedero alterno para la roya que infecta trigo. Esto podría sugerir que las poblaciones de *P. graminis* y *P. striiformis* no estarían sufriendo un ciclo sexual de reproducción en *Berberis* en las zonas muestreadas en el Ecuador, sino que solamente una reproducción asexual en Poaceae. Sin embargo, mayores muestreos y estudios adicionales de patogenicidad serían necesarios para comprobar esta hipótesis. La especie *E. quitensis* fue descrita por primera vez en 1931 por H. S. Jacks y Holw (Mycobank, 2013), y no se han publicado nuevos registros hasta el presente estudio. La separación de esta especie en dos clados con buen soporte, como muestra el análisis filogenético podría indicar que son especies diferentes de roya, para lo cual se requiere de análisis adicionales que clarifiquen esta situación.

Estudios taxonómicos recientes de *P. striiformis sensu lato*, proponen la separación de la especie en 4 linajes monofiléticos: 2 han limitado sus asociaciones uredinales y teliales hacia hospederos de Poae (*P. striiformoides*, en *Dactylis* y *P. pseudostriiformis* en *Poa*); mientras que el tercero, *P. striiformis sensu stricto.*, tiene un rango más amplio de hospederos dentro de la tribu Triticeae; y *P. gansensis* que se encuentra únicamente en *Achnatherum inebrians* (Liu, 2010). En el presente estudio el análisis filogenético concuerda con Liu (2010) en el que se observa los 4 linajes, según el hospedero, pero para *P. striiformoides* adicionalmente se incluyen 3 cepas ecuatorianas pertenecientes a la tribu Aveneae (*Holcus* y

*Anthoxanthum*). Es posible que haya un error en la identificación de estos hospederos para estas muestras. En el caso de *P. striiformis* todas las cepas provienen de un hospedero perteneciente a la tribu Triticeae como lo propone Liu (2010) pero además incluye una cepa con hospedero perteneciente a la tribu Bromeae identificado por análisis de ADN ribosomal. En este caso también es posible que la identificación del hospedero este errada, aunque existen también otros estudios (Hovmøller, 2011) que sugieren que el número de hospederos en hierbas para el clado *striiformis* permanece desconocido, en donde se han reportado hasta 320 especies de hierbas de aproximadamente 50 géneros como susceptibles a *P. striiformis* incluyendo a *Bromus*. Por lo tanto, para esta cepa en particular se requieren estudios adicionales en los que se pueda identificar de manera certera al hospedero. Además, por la cercanía filogenética que tiene esta cepa con las cepas con *P. striiformis* f.sp. *tritici*, también se recomienda realizar pruebas de patogenicidad y virulencia bajo condiciones controladas.

El género *Uromyces* es el segundo más grande después de *Puccinia*, dentro del orden Pucciniales, con más de 600 especies reportadas. Las especies de *Uromyces* son parásitas de un amplio rango de plantas hospederas (Saba, 2011). El presente estudio encontró, 2 especies: *U. transversalis* en *Gladiolus* y *U. pencanus* en *Nasella*; y además ubica como cercana a la cepa PPV-04. *U. transversalis* es un parásito obligado que solamente crece y se reproduce en miembros de la familia Iridaceae, se encuentra en los trópicos y ha sido reportada en Sur América en los países del Caribe, Argentina, Brasil y Colombia (Rizvi, 2007), más no en el Ecuador. Este sería un primer reporte de *U. transversalis* en el país. *U. pencanus* es un parásito obligado de los miembros del género *Nasella*, familia Poaceae, y es utilizado como agente de biocontrol ya que puede causar daños significativos a su hospedero (Anderson,



2012). Los resultados del presente estudio confirman la ocurrencia de esta especie de roya en el Ecuador.

Adicionalmente, se encontraron 9 cepas que no pudieron ser identificadas a partir de análisis moleculares, ya que los registros de GenBank con los cuales se compararon, tenían valores de máximo de identidad relativamente bajos, menores al 95%. Esta circunstancia evidencia la falta de investigación a nivel molecular dentro de las royas, o podría ser que estas cepas representan a especies nuevas que aún no han sido registradas. Estudios adicionales al análisis filogenético, como la microscopía de esporas, serían necesarios para confirmar la identidad de estas cepas.

La diversidad encontrada del género *Puccinia* en este estudio se podría explicar porque el Ecuador reúne las características ideales para el desarrollo de este género. Principalmente la alta diversidad que el Ecuador posee en cuanto a la familia Poaceae, que se encuentra entre las 12 familias más importantes y diversas (Jørgensen, 2006). Algunos estudios sugieren que este y otros géneros como Asteraceae son más susceptibles a la infección por royas (Berndt, 2012). Adicionalmente la región Andina posee las condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo del género *Puccinia* (como la baja temperatura y la alta humedad). En el Ecuador existen muchas regiones, que todavía no han sido investigadas y que son potenciales para realizar estudios de diversidad de royas. Se aconseja realizar más colecciones, análisis moleculares, identificaciones morfológicas, estudios ecológicos y de distribución de estas especies en Poaceae y en otras familias de plantas en el Ecuador ya que la información obtenida podría aportar con el entendimiento de estos organismos.

## **6.2. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* EN EL TRIGO:**

### **6.2.1. ANÁLISIS DE LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS ECUATORIANAS**

Los resultados obtenidos en este estudio muestra que existe una alta diversidad de *P. striiformis* f.sp. *tritici* en el Ecuador, encontrándose 8 razas diferentes en 9 muestras colectadas. En el Ecuador, la resistencia genética a la roya amarilla *P. striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) del trigo ha sido insuficiente. Las variedades modernas de trigo liberadas hasta el momento presentan niveles de resistencia inadecuados para su cultivo. En los estudios desarrollados por el INIAP hasta el año 2003, se identificó virulencia de la roya amarilla para el trigo ecuatoriano que posee los genes Yr1, Yr2, Yr2+, Yr3V, Yr3N, Yr6, Yr6+, Yr7, Yr7+, Yr9, yr9+, YrA+, YrSP, YrSU, YrSD y YrCV, y avirulencia en las plantas con los genes Yr5, Yr8, Yr10 y Yr15, éstos últimos no se han utilizado como fuentes de resistencia en los programas de mejoramiento de nuevas variedades (Ochoa, 2003). En el presente estudio se ha encontrado virulencia en los genes Yr1, Yr6, Yr7, Yr9 y YrSP al igual que las reportadas por el INIAP, pero adicionalmente se encontró virulencia para los genes Yr17, Yr24, Yr26, Yr27, Yr32, Yr43, Yr44, Yr Tyee, Yrtri, YrExp2, YrSP, incluyendo a Yr8 y Yr10 que anteriormente fueron efectivos. Estos resultados indican que la virulencia en las poblaciones de *P. striiformis* f. sp. *tritici* ha incrementado en los últimos años. En contraste, la resistencia ofrecida por los genes Yr5 y Yr15 se ha mantenido efectiva a lo largo del tiempo. En evaluaciones de resistencia en el campo realizada por el Programa de Cereales en los años 2008 y 2009 (Pazmiño, 2012) y en otros estudios en Estados Unidos (Wan & Chen, 2010), Yr5 y Yr15

siguen siendo fuentes efectivas de resistencia hacia razas de *Pst*. Estos últimos genes se recomiendan para su inclusión dentro del desarrollo de nuevas variedades de trigo resistentes.

Al relacionar los resultados obtenidos de virulencia de las cepas con el área de colecta, se observó que para 5 de las 9 cepas que tenían virulencias similares (Ec-1, Ec-2 y Ec-4; y Ec-7 y Ec-8) estas provenían de diferentes localidades (provincias de Carchi, Pichincha y Chimborazo). Esta situación pudiera estar atribuida al uso de variedades de trigo con similares genes de resistencia en las diferentes localidades, lo cual ejercería una presión de selección a favor de los mismos genes de avirulencia en la población del patógeno en esas localidades. Las variedades de trigo utilizadas por los agricultores provienen en su mayoría de la misma fuente de semilla certificada distribuida por el INIAP (INIAP, 2009). Adicionalmente, la similitud en razas encontradas en diferentes localidades puede deberse al flujo de esporas a lo largo de la sierra ecuatoriana entre las provincias estudiadas. Es muy conocido que las esporas de royas pueden viajar largas distancias (Høvmøller *et al.*, 2002), lo cual pudiera ocurrir también en el Ecuador. Por otro lado, existen 2 casos, en donde cepas de la misma localidad tienen virulencias iguales (Ec-3 y Ec-9) o muy parecidas (Ec-5 y Ec-6), lo cual es de esperarse ya que fueron colectadas en la misma variedad de trigo, Cojitambo. No fue posible obtener información acerca de los genes de resistencia específicos presentes en la variedad Cojitambo o de las otras variedades de trigo infectadas, ya que ésta era desconocida. Esta información es muy importante al evaluar la eficacia de los genes de resistencia en el trigo frente a las poblaciones actuales de roya en el Ecuador. Esto evidencia la necesidad de un monitoreo más efectivo de las poblaciones de roya y variedades de trigo en el Ecuador, para lograr un mayor rendimiento del cultivo.

Basadas en los patrones de virulencia o avirulencia hacia diferentes genes de resistencia en los cultivares del trigo, se pueden obtener fórmulas de virulencia para las razas de *Pst* (Cheng, 2012). A partir de estas fórmulas de virulencia, este estudio ha detectado 3 razas descritas anteriormente denominadas Pstv-11, Pstv-14 y Pstv-49 presentes en el Ecuador, y además 5 razas nuevas, las cuales tienen un espectro de virulencia similar pero distinto del grupo de razas detectadas por Chen *et al.* (2010). La aparición de nuevas razas virulentas del hongo está atribuida a mutaciones (de avirulentas a virulentas o en dirección opuesta) en algunos loci y la adaptación hacia la resistencia de los hospederos locales (Chen *et al.*, 2009). Las mutaciones son cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN y son la principal fuente de diversidad genética en poblaciones de roya que resultan en nuevos alelos y genotipos. En las poblaciones de *Pst* la fijación de nuevas mutaciones hacia virulencia se produce a partir de las presiones selectivas generadas por la diversidad de resistencia de los diferentes cultivares sembrados (Chen, 2009), en poco tiempo estos cultivares se vuelven susceptibles a estas nuevas variantes virulentas de la roya (Chen, 2009). En el Ecuador, además, se suman las condiciones climáticas adecuadas de las áreas de cultivo, que crean un escenario favorable para una evolución rápida y flexible del patógeno (Ochoa, 2003). La identificación de nuevas razas y el monitoreo de su distribución y cambios de frecuencia de las razas son importantes para seleccionar nuevos cultivares resistentes para su producción (Wan, 2010).

### **6.2.2. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA CON MICROSATÉLITES**

A partir de la comparación entre los valores de heterocigosidad observada y esperada de los loci analizados se estimó un exceso de la heterocigosidad observada, lo cual se

corroborar a partir del índice de fijación ( $F_{IS}$ ) con un valor negativo. Estos resultados muestran un desvío de las proporciones esperadas bajo un apareamiento al azar. El exceso de heterocigosidad indica que *P. striiformis* f.sp. *tritici* se reproduce de manera asexual. Por otro lado, la reproducción asexual también genera asociaciones no al azar entre los loci, ya que no existe recombinación genética (crossing over), lo que se conoce como desequilibrio de ligamiento ( $r^2$ ) (Meeûs & Balloux, 2004), representado en este estudio con un valor (0,73). La reproducción asexual es común en royas de trigo (Ordoñez *et al.*, 2009) y en organismos parasíticos (Enjalbert, 2005). Adicionalmente, el índice de Shannon para la roya amarilla en el presente estudio, (0,517) es relativamente alto y similar con valores de otros estudios de diversidad para microsatélites en *Pst* realizados en Estados Unidos (Cheng, 2012) con un valor máximo de diversidad de Shannon de 0,54 y en China en el área de Gansu, una de las áreas más diversa de *Pst*, con un valor de 0,93 (Shan *et al.* 1998). Esta variabilidad genética obtenida para los loci que determinan virulencia o avirulencia, así como los microsatélites, en ausencia de recombinación sexual en las poblaciones de roya, puede provenir de mutaciones (Ordoñez, 2009), las cuales contribuyen a mantener el *fitness* poblacional, a pesar de la falta de recombinación sexual, sin la acumulación de mutaciones deletéreas y la depresión o extinción poblacional (Enjalbert, 2005). La hibridización somática que involucra la fusión de hifas vegetativas dicarióticas, intercambio nuclear y la posibilidad de intercambio cromosómico completo entre dos núcleos (Cheng, 2012), también pudiera contribuir a aumentar la diversidad en organismos asexuales. Sin embargo, la posibilidad de hibridización o apareamiento sexual también podría darse en las poblaciones de la roya amarilla. Se ha propuesto que *Berberis* podría ser el hospedero alterno donde se produce el estadio sexual de *P. striiformis* f.sp. *tritici* (Jin *et al.* 2010). En el Ecuador se han reportado 32 especies de

*Berberis*, todas ubicadas sobre los 2000msnm y especialmente en el subpáramo (Ulloa Ulloa, 2013), en donde se encuentra la temperatura ideal para el desarrollo de la roya amarilla. A pesar de esto, los resultados del análisis genético realizado en este estudio no han encontrado evidencia de reproducción sexual para *Pst* en *Berberis*. Además, la roya encontrada en *Berberis* reportada en este estudio corresponde a *E. quitensis*, y no al género *Puccinia*. Se requiere de estudios adicionales en los cuales se realicen más colecciones de royas infectando *Berberis* y pruebas de patogenicidad de *Pst* en especies de *Berberis* locales para determinar si la roya amarilla en el Ecuador pudiera completar su ciclo sexual en el hospedero alterno.

Los análisis de Mantel mostraron una baja correlación entre la matriz de distancias genéticas de microsatélites con la de virulencia. Esto se debe a que los locus de microsatélites, son neutros, por lo que no se encuentran bajo presión selectiva, mientras que la virulencia si está bajo presión selectiva generada por el hospedero. Estudios previos en *Pst* también muestran muy baja o ninguna asociación entre genotipos moleculares y virulencia (Chen, 1993). Sin embargo, en este estudio existe cierta correlación entre la virulencia y los microsatélites de las cepas analizadas en este estudio ( $R=0,133$ ). Las cepas Ec-4, Ec-2, Pst-35 y Pst-37 con virulencia semejante, también presentan semejanza en microsatélites (Figura 4), a pesar de tener una procedencia distinta, algo similar ocurre entre las cepas Ec-7 y Ec-8 que en la virulencia fueron cercanas y en los microsatélites son idénticas a pesar de proceder de diferentes provincias. Estos datos sugieren que estas cepas pudieran tener un ancestro en común, y luego de dispersarse se diferenciaron debido a la acumulación de mutaciones. Por otro lado existen cepas como la Ec-9 y Ec-3 con igual virulencia pero son diferentes en los microsatélites. Esto podría deberse a que estas cepas adquirieron una virulencia parecida ya que la variedad de trigo que infectaron generó una presión selectiva similar en estas.

El presente análisis muestra una alta diversidad de *Pst* en el Ecuador, pero los estudios realizados son todavía escasos en cuanto a la distribución, la genética, ocurrencia en hospederos alternos (*Berberis*), y la dinámica poblacional. Se requieren todavía de más estudios sobre estos temas para obtener un mejor entendimiento que permita combatir de manera efectiva a las poblaciones de roya amarilla en el Ecuador.

## 7. LITERATURA CITADA

- Abbasi, M., Goodwin, S., Scholler, M. 2005. Taxonomy, phylogeny and distribution of *Puccinia graminis*, the black stem rust: new insights based on rDNA sequence data. The Mycological Society of Japan and Springer 46: 241-247.
- Agrios, G. 1997. Plant Pathology, Imprenta Academic Press, Florida, Estados Unidos. pp. 122-124.
- Agrytec. 2010. Nuevas variedades para la recuperación del trigo y cebada entregó el Iniap. [En línea]. <[http://agrytec.com/agricola/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2679:nuevas-variedades-para-la-recuperacion-del-trigo-y-cebada-entrego-el-iniap&catid=52:noticias&Itemid=27](http://agrytec.com/agricola/index.php?option=com_content&view=article&id=2679:nuevas-variedades-para-la-recuperacion-del-trigo-y-cebada-entrego-el-iniap&catid=52:noticias&Itemid=27)>. [Consultado: Junio, 2011].
- Alfen, N. 2002. Fungal pathogens of plants. University of California. California-United States of America.
- Anderson, F., Gallego, L., Sánchez, R., Barton, J., McLaren D. 2012. Biological control of Chilean needle grass (*Nassella neeriana*, Poaceae) in Australasia. Eighteenth Australasian weeds Conference. Review. Australia.
- Benbouza, H., Jacquemin, J., Baudoin, J., Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnology, Agronomy Society and Environment 10 (2): 77-81.
- Berndt, R. 2012. Species richness, taxonomy and peculiarities of the neotropical rust fungi: are they more diverse in the Neotropics. Biodiversity and Conservation 21: 2299-2322.
- Broad Institute. 2010. *Puccinia* Group database. [En línea]. <[http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/puccinia_group/MultiHome.html)>. [Consultado: Octubre, 2012].



- Chen, X. Line, R. 1992. Inheritance of stripe rust resistance in wheat cultivars used to differentiate races of *Puccinia striiformis* in North America. *Phytopathology* 82: 633-637.
- Chen, X., Line, R.F., and Leung, H. 1993. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathology* 83: 1489-1497
- Chen, X. 2005. Epidemiology and control of strip rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Plant Pathology* 27: 314-337.
- Chen, W., Wu, L., Liu, T., Xu, S. 2009. Race dynamics, diversity, and virulence evolution in *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, causal agent of wheat stripe rust in China from 2003 to 2007. *Plant Disease* 93(11): 1093-1101.
- Chen, X., Penman, L., Wan, A., Cheng, P. 2010. Virulence races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in 2006 and 2007 and development of wheat stripe rust and distributions, dynamics and evolutionary relationships of races from 2000 to 2007 in the United States. *Canadian Journal of Plant Pathology* 32(3): 315-333.
- Cheng, P. 2012. Development and use of cDNA-Derived SSR Markers for studying *Puccinia striiformis* population and molecular mapping of new genes for effective resistance to stripe rust in durum wheat. Tesis de Doctorado en Filosofía. Washington State University. Pullman, Estados Unidos de América
- Cheng, P., Chen, X., Xu, L., See, D.R. 2012. Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Ecology Resources*. 12: 779-781.
- Cummins, G., Hiratsuka, Y. 1991. Illustrated genera of rust fungi. The American Phytopathological Society, Minnesota, United States of America.

- El Mercurio. 2011. INIAP fomenta el cultivo del trigo en Ecuador. [En línea].  
<[http://www.elmercurio.com.ec/286614-iniap-fomenta-el-cultivo-del-trigo-en-ecuador.h](http://www.elmercurio.com.ec/286614-iniap-fomenta-el-cultivo-del-trigo-en-ecuador.html)  
tml> [Consultado: Junio, 2011].
- Enjalbert. 2005. Genetic evidencie of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) within France. *Molecular Ecology* 14: 2065-2073.
- Florencia, M., Huerta, J., Villaseñor, H., Sandoval, J., Singh, R. 2009. Análisis de virulencia de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los valles altos del México. *Agrociencia* 44: 491-502.
- Freeman, S., Herron, J. 2004. *Evolutionary Analysis*. Imprenta Pearson Prentice Hall. Estados Unidos. pp. 142, 562, 563.
- Gardes, M., Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Hambleton, S., Liu, M. 2012. Laying the foundation for a taxonomic review of *Puccinia coronata* s.l. in a phylogenetic context. *Mycol Progress* 12: 63-86.
- Hovmøller, M., Justesen, A., Brown, J. 2002. Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in north-west Europe. *Plant Pathology* 51: 24-32.
- Hovmøller, M., Sørensen, C., Walter, S., Justesen, A. 2011. Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses. *Phytopathology* 49: 197-217.
- INIAP. 2009. Plan de recuperación y fomento del cultivo de trigo en Ecuador, mediante el desarrollo y producción de semilla con énfasis en difusión de variedades mejoradas, transferencia de tecnología y capacitación. INIAP. Quito-Ecuador.

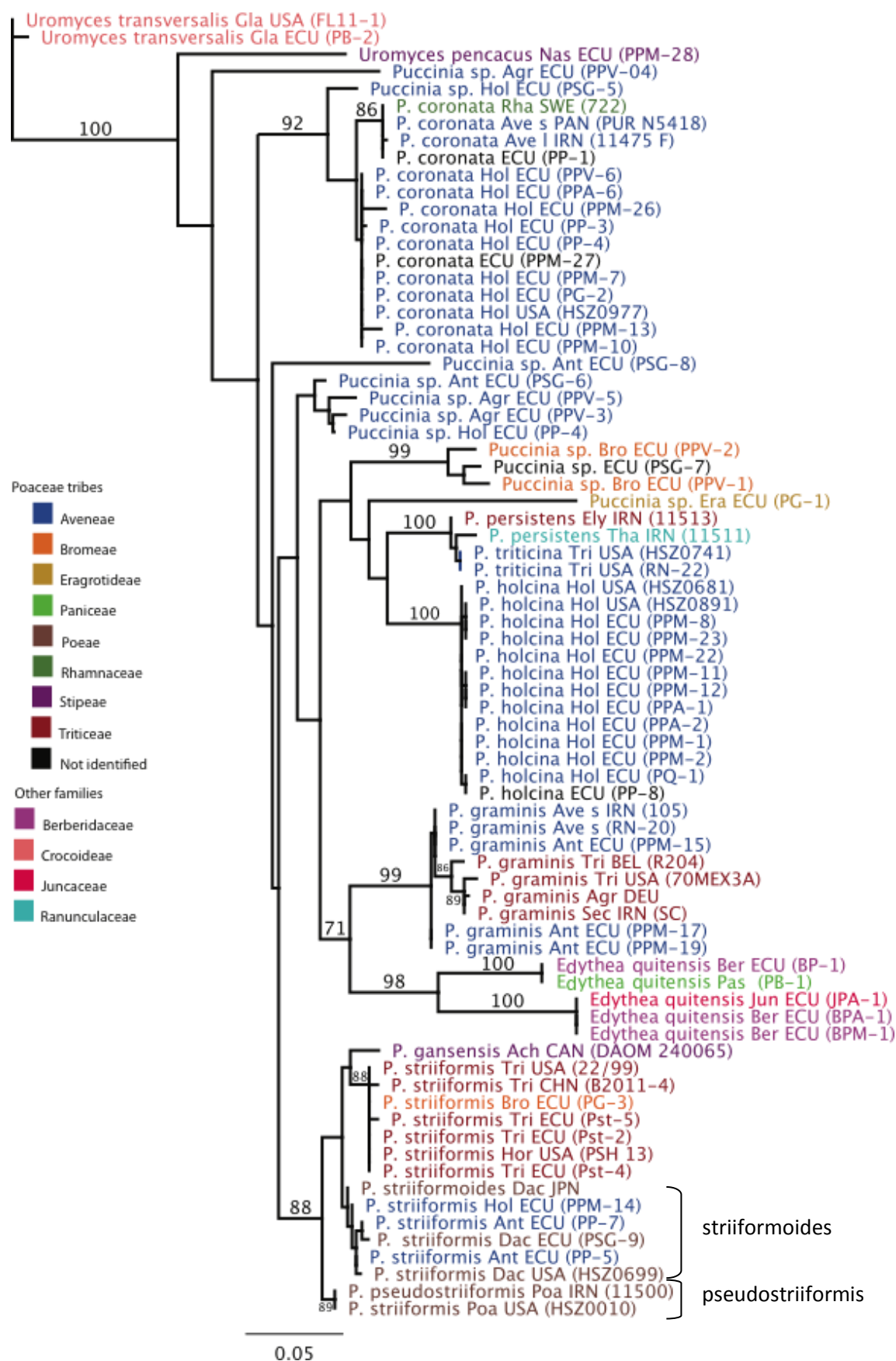
- Jin, Y., Szabo, L., Carson, M. 2010. Century-Old Mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology* 100: 432-435.
- Jørgensen, P., Ulloa, C., Maldonado. 2006. Riqueza de plantas vasculares. *Botánica Económica de los Andes Centrales* 2006: 37-50.
- Kolmer, J., Ordoñez, M., Groth, J. 2009. The rust Fungi. *Encyclopedia of Life Science*.
- León-Yáñez, S. 2000. La flora de los páramos ecuatorianos. Serie Páramo #7: Biodiversidad en los Páramos. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.
- Line, R., Qayoum, A. 1992. Virulence, aggressiveness, evolution, and distribution of races of *Puccinia striiformis* (The cause of strip rust of wheat) in North America, 1968-87. U.S Department of Agriculture, Washington State University. Washington-United States of America.
- Liu, M., Hambleton, M. 2010. Taxonomic study of stripe rust, *Puccinia striiformis sensu lato*, based on molecular and morphological evidence. *Fungal Biology* 114: 881-899.
- Meeûs, T., Balloux, F. 2004. Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 345-351.
- Mycobank. 2013. Fungal Databases Nomenclature and Species Banks (*Edythea quitensis*). International Mycological Association. [En línea] [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr\\_=275988](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=275988) [Consultado: Agosto, 2013]
- Ochoa, J., 2003. La roya amarilla del trigo en el Ecuador aspectos epidemiológicos y de resistencia. Departamento Nacional de Protección Vegetal. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador.

- Ordoñez, M., Kolmer, J. 2009. Differentiation of Molecular Genotypes and Virulence Phenotypes of *Puccinia triticina* from Common Wheat in North America. *Phytopathology* 99 (6): 750-758.
- Pazmiño, V. 2012. Evaluación de la respuesta del germoplasma de trigo (*Triticum aestivum* L.) del INIAP a la aplicación de dos métodos biotecnológicos para la obtención y selección de plantas resistentes a la roya amarilla. Tesis de Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Peakall, R., and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6:288-295.
- Priyamvada, Saharan, M., and Tiwari, R. 2011. Durable resistance in wheat. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 3(8): 108-114
- Rizvi, S. 2007. Gladiolus Rust (*Uromyces transversalis*): A national management plan for exclusion and eradication. United States Department of Agriculture. Estados Unidos.
- Roelfs, A., Singh, R. y Saari, E. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades, México, México.
- Saba, M., Khalid, A., Afshan, N. 2011. Species of the genus *Uromyces* (Basidiomycota: Pucciniales) from Leepa Valley, Azad Jammu and Kashmir (AJ and K), Pakistan. *African Journal of Biotechnology* 10 (73): 16480-16483.
- Sandoval-Islas, J., Broers H., Flores, H. 2002. Genética de la resistecia cuantitativa a la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) en tres cultivares de cebada. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(3): 265-270.

- Shan, W., Chen, S., Kang, Z., Wu, L., Qi, Z. 1998. Genetic diversity in *Puccinia striiformis* Westend. f.sp. *tritici* revealed by pathogen genome-specific repetitive sequence. Canadian Journal of Botany 76(4): 587-595.
- SICA. 2002. Resultados del Censo Agropecuario. CD. MAG-SICA. Quito, Ecuador.
- Sklenář, P., Luteyn, J., Ulloa, C., Jørgensen, P., Dillon, M. 2005. Flora Genérica de los Páramos. The New York Botanical Garden. Volumen 92. New York-Estados Unidos.
- Ulloa Ulloa, C., Jørgensen, P. 2013. Árboles y Arbustos de los Andes del Ecuador (Berberis L.) [En línea]. <[http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=201&taxon\\_id=103816](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=103816)>. [Consultado: Agosto, 2013].
- Vásconez, P., Medina, G., Hofstede, R. 2001. Los Páramos del Ecuador. Botánica Económica de los Andes Centrales 2006: 91-109.
- Vialle, A., Feau, N., Allaire, M., Didukh, M., Martin, F., Mocalvo, J., Hamelin, R. 2009. BARCODING FUNGI Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. Molecular Ecology Resources 9: 99-113.
- Wan, A., Chen, X. 2010. Virulence characterization of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* using single-gene line differentials and identification of races of *P. striiformis* f.sp. *hordei* in the United States in 2010. Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, and Department of Plant Pathology, Washington State University, Washington-United States of America.
- Wan, A., Chen, X., 2012. Virulence, frequency, and distribution of races of *Puccinia striiformis* f. sp. *Hordei* identified in the United States in 2008 and 2009. Plant Disease 96 (1): 67-74.

- Webster, J., Weber R. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge University. New York-United States of America.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: a guide to method and applications pp. 315-322. Academic Press, Inc, San Diego, U.S.A.
- Yeh, F., Yang, R, Boyle, Y. 2000. Popgene. POPGENE V1.3. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research, Canadá.
- Zuluaga, M., Buriticá, P, 2008. Generalidades de los Uredinales (*Fungi:Basidiomycota*) y de sus relaciones filogenéticas. Laboratorio de Estudios Moleculares, Departamento de Ciencias Agronómicas, Universidad Nacional de Colombia. Medellin-Colombia.

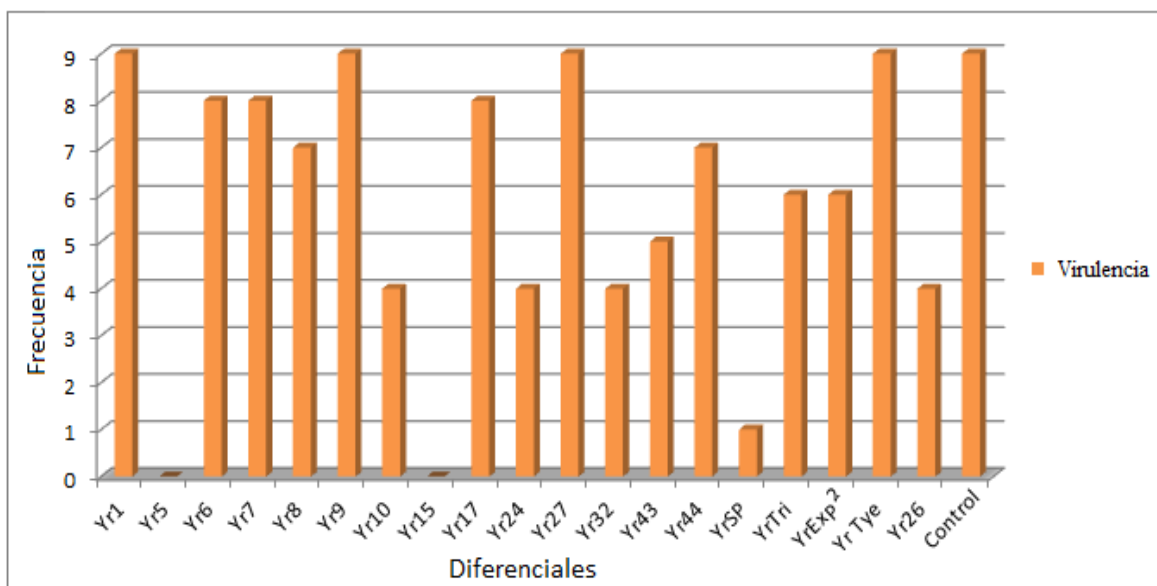
## **8. FIGURAS**



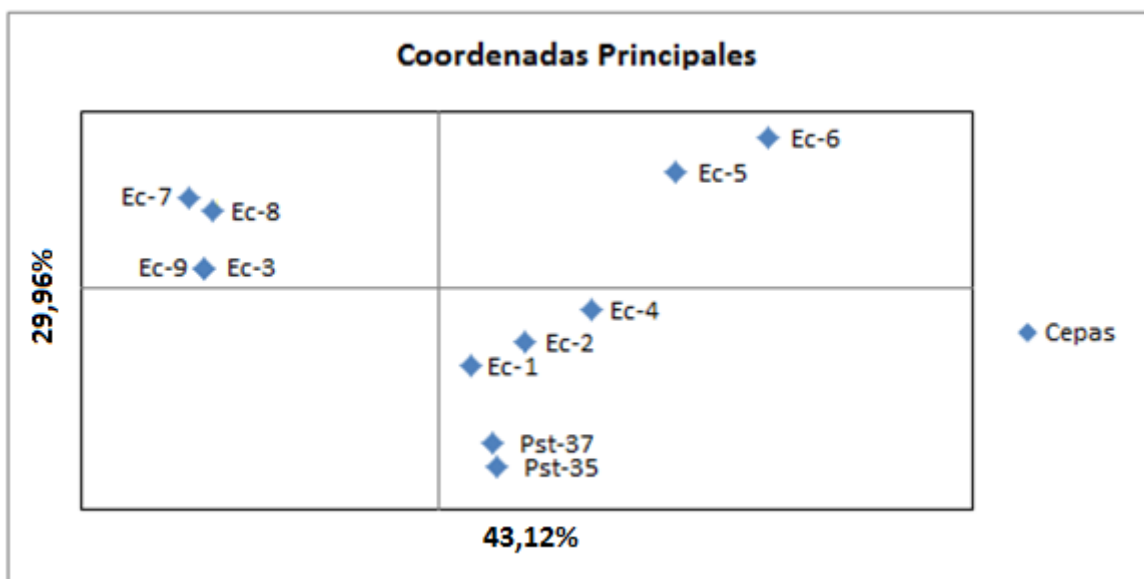


**Figura 1.** Árbol del análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de la región ITS1, 5.8s e ITS-2 del género *Puccinia*. Los valores sobre las ramas representan valores de bootstrap >70%. Los colores corresponden a las familias de los hospederos y en Poaceae representan la tribu a la que pertenecen. El símbolo ] designa a todas las cepas que corresponden a las especies conocidas como *P. striiformoides* y *P. pseudostriiformis* propuesto por Liu *et al.*, 2010.

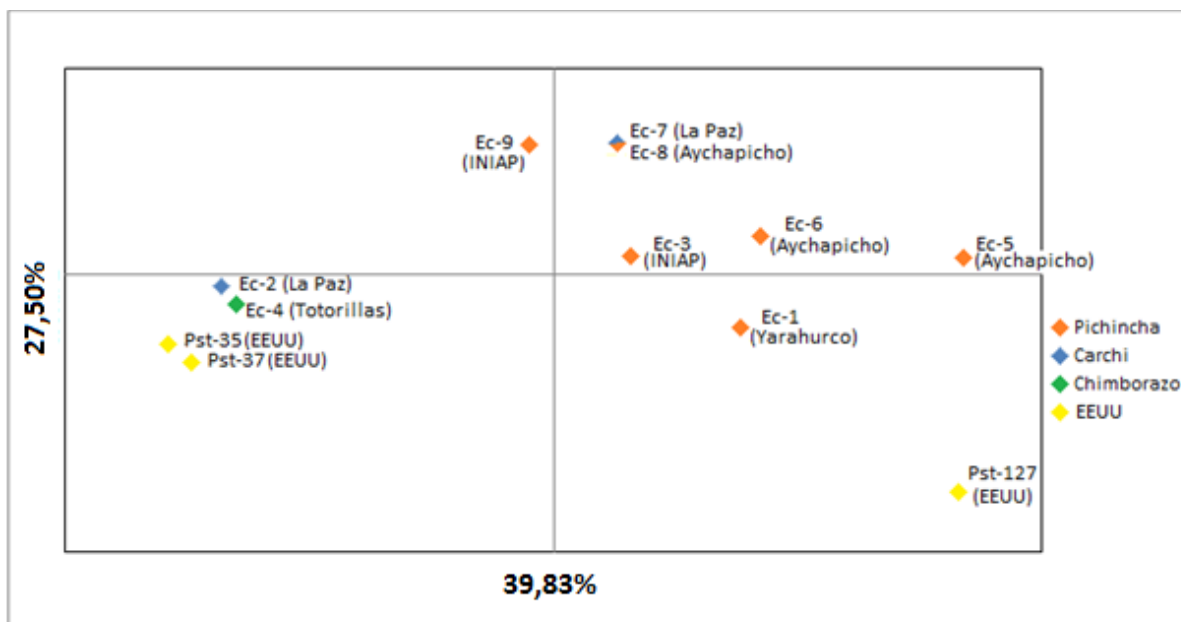
**Figura 2.** Frecuencia de virulencia de las cepas de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ecuatorianas hacia los 20 diferenciales de *Triticum aestivum*.



**Figura 3.** Análisis de coordenadas principales según la virulencia de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* en 20 plantas diferenciales de trigo.



**Figura 4:** Análisis de coordenadas principales según la distancia genética de 14 loci de microsatélites de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Los colores representan la localidad de origen de las muestras.



## **9. TABLAS**

**Tabla 1.** Muestras de *Puccinia* colectadas en las Provincias de Pichincha, Napo, Tungurahua, Carchi y Bolivar para el estudio de la diversidad genética del género *Puccinia* en Poaceae y muestras de *Uromyces* y *Edythea* presentes en los hospederos de las familias Juncaceae, Crocoideae y Berberidaceae

Código	Fecha de Colección	Localidad	Coordenadas (Decimal Degrees)	Altitud	Familia, tribu y especie del hospedero	Especie de Roya
PPM-01	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPM-02	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPM-03	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PPM-04	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PPM-05	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PPM-06	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PPM-07	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PPM-08	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPM-09	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PPM-10	17/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PPM-11	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>

**Tabla 1.** Continuación.

Código	Fecha de Colección	Localidad	Coordenadas	Altitud	Familia, tribu y especie del hospedero	Especie de Roya
PPM-12	17/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPM-13	17/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PPM-14	28/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia striiformis</i>
PPM-15	17/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i>	<i>Puccinia graminis</i>
PPM-16	28/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i>	-
PPM-17	28/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i>	<i>Puccinia graminis</i>
PPM-18	28/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i>	-
PPM-19	28-oct-12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i>	<i>Puccinia graminis</i>
PPM-20	28/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i>	-
PPM-21	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	No identificada	-
PPM-22	13-oct-12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPM-23	13-oct-12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>

**Tabla 1.** Continuación

Código	Fecha de Colección	Localidad	Coordenadas	Altitud	Familia, tribu y especie del hospedero	Especie de Roya
PPM-24	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	No identificada	-
PPM-25	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	No identificada	-
PPM-26	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PPM-27	28/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	No identificada	<i>Puccinia coronata</i>
PPM-28	27/11/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.46958°, -0.17456°	2890	Poaceae, Stipeae, <i>Nasella</i> sp.	<i>Uromyces pencanus</i>
BPM-01	13/10/12	Pichincha, Parque metropolitano de Quito	-78.4857432°, 0.2311065°	2890	Berberidaceae, Berberidae <i>Berberis hallii</i>	<i>Edythea quitensis</i>
PG-01	09/12/12	Pichincha, Guayllabamba	-78,334943°, -0.076480°	2406	Poaceae, Eragrotideae, <i>Sporobulus</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PG-02	09/12/12	Pichincha, Guayllabamba	-78,334943°, -0.076480°	2406	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PG-03	09/12/12	Pichincha, Guayllabamba	-78,334943°, -0.076480°	2406	Poaceae, Bromeae, <i>Bromus catharticus</i>	<i>Puccinia striiformis</i>
PQ-01	01/08/12	Pichincha, Quito	-78,522910°, -0.35642°	3042	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPV-01	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Bromeae, <i>Bromus</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PPV-02	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Bromeae, <i>Bromus</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PPV-03	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Aveneae, <i>Agrostis</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PPV-04	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Aveneae, <i>Agrostis</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.

**Tabla 1.** Continuación.

Código	Fecha de Colección	Localidad	Coordenadas	Altitud	Familia, tribu y especie del hospedero	Especie de Roya
PPV-05	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Aveneae, <i>Agrostis</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PPV-06	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PPV-07	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	-
PPV-08	15/11/12	Napo, Páramo de la virgen	-78.2301705°, 0.3136089°	4200	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	-
PP-01	15/11/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	No identificado	<i>Puccinia coronata</i>
PP-02	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PP-03	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PP-04	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
PP-05	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	<i>Puccinia striiformis</i>
PP-06	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	-
PP-07	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	<i>Puccinia striiformis</i>
PP-08	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	No identificado	<i>Puccinia holcina</i>
BP-01	03/12/12	Napo, Termas de Papallacta	-78.141002°, 0.3774959°	3300	Berberidaceae, Berberideae <i>Berberis</i> cf. <i>pichinchensis</i>	<i>Edythea quitensis</i>
PB-01	07/12/12	Tungurahua, Baños	-520.32584°, 93.030510°	1815	Poaceae, Paniceae, <i>Paspalum</i> sp.	<i>Edythea quitensis</i>
PB-02	07/12/12	Tungurahua, Baños	-520.32584°, 93.030510°	1820	Crocoideae, Ixieae <i>Gladiolus</i> sp.	<i>Uromyces transversalis</i>
PPA-01	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3197	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>



**Tabla 1.** Continuación.

Código	Fecha de Colección	Localidad	Coordenadas	Altitud	Familia, tribu y especie del hospedero	Especie de Roya
PPA-02	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3735	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia holcina</i>
PPA-03	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3735	Poaceae, Aveneae, <i>Agrostis</i> sp.	-
PPA-04	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3778	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	-
PPA-05	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3782	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	-
PPA-06	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3524	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia coronata</i>
BPA-01	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3343	Berberidaceae, Berberideae, <i>Berberis grandiflora</i>	<i>Edythea quitensis</i>
JPA-01	12/01/13	Carchi, Páramo del Ángel	-77,966666°, 0.7166667°	3704	Juncaceae, Juncus, <i>Luzula</i> sp	<i>Edythea quitensis</i>
PSG-01	27/01/13	Bolivar, Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3588	No identificado	-
PSG-02	27/01/13	Bolivar, Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3907	No identificado	-
PSG-03	27/01/13	Bolivar, Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3907	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	-
PSG-04	27/01/13	Bolivar, Salinas de Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3574	No identificado	-
PSG-05	27/01/13	Bolivar, Salinas de Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3574	Poaceae, Aveneae, <i>Holcus lanatus</i>	<i>Puccinia</i> sp.
PSG-06	27/01/13	Bolivar, Salinas de Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3526	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PSG-07	27/01/13	Bolivar, Salinas de Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3619	No identificado	<i>Puccinia</i> sp.

**Tabla 1.** Continuación.

Código	Fecha de Colección	Localidad	Coordenadas	Altitud	Familia, tribu y especie del hospedero	Especie de Roya
PSG-08	27/01/13	Bolivar, Salinas de Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3634	Poaceae, Aveneae, <i>Anthoxanthum</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.
PSG-09	27/01/13	Bolivar, Salinas de Guaranda	-79.001246°, -1.5934930°	3634	Poaceae, Poae, <i>Dactylis glomerata</i>	<i>Puccinia striiformis</i>

**Tabla 2.** Muestras de *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* colectadas de hojas de trigo (*Triticum aestivum*) en las provincias de Pichincha, Carchi y Chimborazo

No. de muestra	Fecha de colección	Provincia	Sector	Variedad de trigo
Ec-1	27/07/2011	Pichincha	La Esperanza-Hacienda Yarahurco	Vivar
Ec-2	26/07/2011	Carchi	Cantón Montufar-La Paz	- <sup>1</sup>
Ec-3	15/08/2011	Pichincha	Cantón Mejía-INIAP	-
Ec-4	08/08/2011	Chimborazo	Cantón Guamote-Granja Totorillas	-
Ec-5	22/06/2011	Pichincha	Guatucucho-Hacienda Aychapicho	Cojitambo
Ec-6	22/06/2011	Pichincha	Guatucucho-Hacienda Aychapicho	Cojitambo
Ec-7	07/09/2011	Carchi	Cantón Montufar-La Paz	-
Ec-8	22/06/2011	Pichincha	Guatucucho-Hacienda Aychapicho	Cojitambo
Ec-9	30/09/2011	Pichincha	Cantón Mejía-INIAP	-

<sup>1</sup>Variedad desconocida

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para la identificación de royas y hospederos del género *Puccinia* en Poaceae

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (°C) <sup>1</sup>
ITS-1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	59.1
ITS-1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	56.6
ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	52.4
ITS4-BR	5'-TCAACAGACTTGTACATGGTCC-3'	60.3
ITS4-BR2	5'-GGATTATCACCTCAATGAT-	54.3

<sup>1</sup> Temperatura de fusión

**Tabla 4.** Combinaciones de cebadores utilizados para la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal de las muestras analizadas y su temperatura de hibridación.

Código de combinación	Combinación	Temperatura de Hibridación	Tipo de ADN
A	ITS-1F / ITS4-BR	50°C	Roya
B	ITS-1 / ITS-4	50°C	Roya
C	ITS-1F / ITS-4	50°C	Planta hospedera /Roya
D	ITS-1F / ITS-4BR2	50°C	Roya
E	ITS-1F / ITS-4BR2	54°C	Roya

**Tabla 5.** Cultivares de plantas diferenciales del trigo utilizados para evaluar razas de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Chen *et al.*, 2010).

Nombre del cultivar	Genes de resistencia Yr presente en el cultivar
AvSYr1NIL	Yr1
AvsYr5NIL	Yr5
AvSYr6NIL	Yr6
AvSYr7NIL	Yr7
AvSYr8NIL	Yr8
AvSYr9NIL	Yr9
AvSYr10NIL	Yr10
AvSYr15NIL	Yr15
AvSYr17NIL	Yr17
AvSYr24NIL	Yr24
AvSYr27NIL	Yr27
AvSYr32NIL	Yr32
Avs/IDO377s (F3-41-1)	Yr43
Avs/Zak (1-1-35-Line 1)	Yr44
AvSYrSPNIL	YrSP
AvSYrTres1NIL	YrTr1
Avs/Exp1/1-1 Line74	YrExp <sup>2</sup>
AvsTyeeNIL	YrTye
AvSYr26NIL	Yr26
Avs(Control)	-

**Tabla 6.** Cebadores de microsatélites utilizados para *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, según Wan *et al.*, 2010

Locus	Motivo de Repetición	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tm (°C)
<sup>a</sup> PstP001	(CTA) <sub>6</sub>	F: ACCATCGGATTCCTGC R: ACGGTAGGCGAACGAC	49
PstP002	(ACT) <sub>6</sub>	F: CTGACCATCGGATTCCTGC R: TGAACGGTAGGCGAACGAC	53
PstP003	(AATA) <sub>5</sub>	F: TAACCCACGGCAACTCA R: ATCGTTGGCAGCCTTACC	50
PstP004	(TCA) <sub>6</sub>	F: TCTCGCCTCGCTTGAATG R: TCGCTGGAGTTGGATGGA	50
<sup>a</sup> PstP005	(ACC) <sub>6</sub>	F: CCAACAGGTCAAACCTACCA R: TCCGCTTCGATCATAGCAC	52
<sup>a</sup> PstP007	(GAA) <sub>9</sub>	F: GATTTGCGAGGTCACCTT R: TGGTTGTGATAACGATGA	46
PstP008	(CAA) <sub>7</sub>	F: CCCTTGAGTAGTATGACC R: AGAAGAGGACGAGAAGAT	48
PstP021	(CT) <sub>8</sub>	F: CCTCGACGCCCTCATTC R: TTGGTGACGAGCAGGTAT	52
<sup>a</sup> PstP025	(GA) <sub>9</sub>	F: ATGTAAATGTAGCACCAAAC R: TCATGCTCGGTATGTCTC	48
PstP028	(AAG) <sub>6</sub>	F: GCATTCAAACAGCAGCAA R: GGTTAGGGTATGGCAAGG	50
<sup>a</sup> PstP029	(CCA) <sub>9</sub>	F: ACAATCCTCAAGGTGGTG R: GTTCGCTTTGTTGGTTAT	48
<sup>a</sup> PstP030	(GAT) <sub>6</sub>	F: AAGGAAAAGAACTGTATG R: TTCAGATGCTCTATTCAA	41
PstP031	(GAA) <sub>12</sub>	F: TTGGGCGTCCTGGCATTG R: ACCCGTTCCTTCTTGGTCTTGC	57
<sup>a</sup> PstP033	(AC) <sub>8</sub>	F: ACAGAAGGAAGGCAGATT R: GGGGTTTGATGTTATTAC	46

<sup>a</sup> Cebadores utilizados para la PCR y el protocolo de electroforesis en geles de poliacrilamida

**Tabla 7.** Número de especies de royas identificadas por hospedero.

Familia, especie del hospedero	Especies de royas encontradas							
	<i>Puccinia holcina</i>	<i>Puccinia coronata</i>	<i>Puccinia striiformis</i>	<i>Puccinia graminis</i>	<i>Puccinia sp.</i>	<i>Edythea quitensis</i>	<i>Uromyces transversalis</i>	<i>Uromyces pencanus</i>
<b>Poaceae</b>								
<b>Tribu Aveneae</b>								
• <i>Agrostis</i> sp.	-	-	-	-	3	-	-	-
• <i>Anthoxanthum</i> sp.	-	-	2	3	2	-	-	-
• <i>Holcus lanatus</i>	10	9	1	-	1	-	-	-
<b>Tribu Bromeae</b>								
• <i>Bromus</i> sp.	-	-	-	-	2	-	-	-
• <i>Bromus catharticus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
• <i>Dactylis glomerata</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<b>Tribu Paniceae</b>								
• <i>Paspalum</i> sp.	-	-	-	-	-	1	-	-
<b>Tribu Poae</b>								
• <i>Sporobolus</i> sp.	-	-	-	-	1	-	-	-
<b>Tribu Stipiae</b>								
• <i>Nasella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>No identificada</b>	1	2	-	-	1	-	-	-

**Tabla 7.** Continuación.

Familia y especie del hospedero	Especies de royas encontradas							
	<i>Puccinia holcina</i>	<i>Puccinia coronata</i>	<i>Puccinia striiformis</i>	<i>Puccinia graminis</i>	<i>Puccinia sp.</i>	<i>Edythea quitensis</i>	<i>Uromyces transversalis</i>	<i>Uromyces pencanus</i>
<b>Berberidaceae</b>								
• <i>Berberis grandiflora</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
• <i>Berberis hallii</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
• <i>Berberis</i> cf. <i>pichinchensis</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<b>Crocoideae</b>								
• <i>Gladiolus</i> sp	-	-	-	-	-	-	1	-
<b>Juncaceae</b>								
• <i>Luzula</i> sp.	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Total</i>	11	11	5	3	10	5	1	1



**Tabla 8.** Resultados de las pruebas de virulencia de *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* en 20 diferenciales de trigo.

Genes de Virulencia	Muestras								
	Ec-1	Ec-2	Ec-3	Ec-4	Ec-5	Ec-6	Ec-7	Ec-8	Ec-9
Yr1	8 <sup>a</sup>	8	8	8	8	8	8	8	8
Yr5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Yr6	8	8	8	8	2-3	8	8	8	8
Yr7	8	8	7	8	8	<u>2</u> -3	8	5	7
Yr8	8	8	8	7	<u>2</u> -3	<u>2</u> -3	7	7	7
Yr9	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Yr10	1	1	8	1	1	1	8	8	7
Yr15	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Yr17	8	8	7	8	8	2	8	8	7
Yr24	2	2	8	3	2	2	8	8	6
Yr27	8	8	7	8	8	6	7	8	8
Yr32	2-3	2	8	<u>3</u> -4	2	2	6	8	6
Yr43	8	8	7	7	2	2	<u>3</u> -4	4	8
Yr44	8	8	8	6	<u>2</u> -3/6	<u>2</u> -3	5	7	7
YrSP	1-8	1	1	1	1	1	8	1	1
YrTr1	5	2-3	8	<u>3</u> -4	8	2	7	8	8
YrEx <sup>2</sup>	8	8	7	<u>3</u> -4	2-3	2	7	8	7
YrTye	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Yr26	2	2	8	4	2	2	<u>7</u> - <u>8</u>	8	7
Control	8	8	8	8	8	8	8	8	8

<sup>a</sup> Los números del 1 al 9 representan a los valores de virulencia citados en los anexos 19 y 20, donde los valores del 1 al 4 se consideran como cepas avirulentas y del 5 al 9 como virulentas.

**Tabla 9.** Matriz de distancias genéticas basada en la virulencia de las 9 cepas ecuatorianas y 2 cepas de Estados Unidos (usadas como control) de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* en los 20 diferenciales de trigo.

Ec-1	Ec-2	Ec-3	Ec-4	Ec-5	Ec-6	Ec-7	Ec-8	Ec-9	Pst-35	Pst-37	
0											Ec-1
1	0										Ec-2
3	4	0									Ec-3
2	1	5	0								Ec-4
5	6	8	5	0							Ec-5
7	6	10	5	4	0						Ec-6
5	6	2	7	8	10	0					Ec-7
4	5	1	6	7	9	1	0				Ec-8
3	4	0	5	8	10	2	1	0			Ec-9
3	4	6	5	8	10	8	7	6	0		Pst-35
2	3	5	4	7	9	7	6	5	1	0	Pst-37

**Tabla 10.** Tamaño de alelos y frecuencias alélicas para cada loci de microsatélites de muestras de *Puccinia striiformis* f.sp *tritici*.

Locus	Tamaño de la muestra	Alelo pb	Frecuencia	Locus	Tamaño de la muestra	Alelo pb	Frecuencia
PstP001	12	330	0,250	PstP008	11	426	0,818
		336	0,667			429	0,182
		339	0,083	PstP021	12	174	1
PstP002	11	337	0,318	PstP025	12	337	0,250
		343	0,591			357	0,750
		346	0,091	PstP028	12	461	1
PstP003	11	202	0,636	PstP029	12	168	0,083
		218	0,364			171	0,208
PstP004	9	470	0,278			174	0,708
		473	0,278	PstP031	10	275	1
		476	0,444	PstP033	11	404	0,091
PstP005	11	294	0,818			418	0,364
		300	0,182			422	0,545
PstP007	9	268	0,944	PstP034	12	185	0,125
		295	0,056			187	0,875

**Tabla 11.** Índices estadísticos promedio de los 14 loci de las cepas de *Puccinia striiformis* f.sp *tritici* analizadas.

Parámetros <sup>a</sup>	N	Na	Ne	I	Ho	He	F <sub>IS</sub>
Promedio	11,071	2,143	1,626	0,517	0,362	0,317	-0,151
SE	0,286	0,206	0,149	0,097	0,066	0,060	0,031

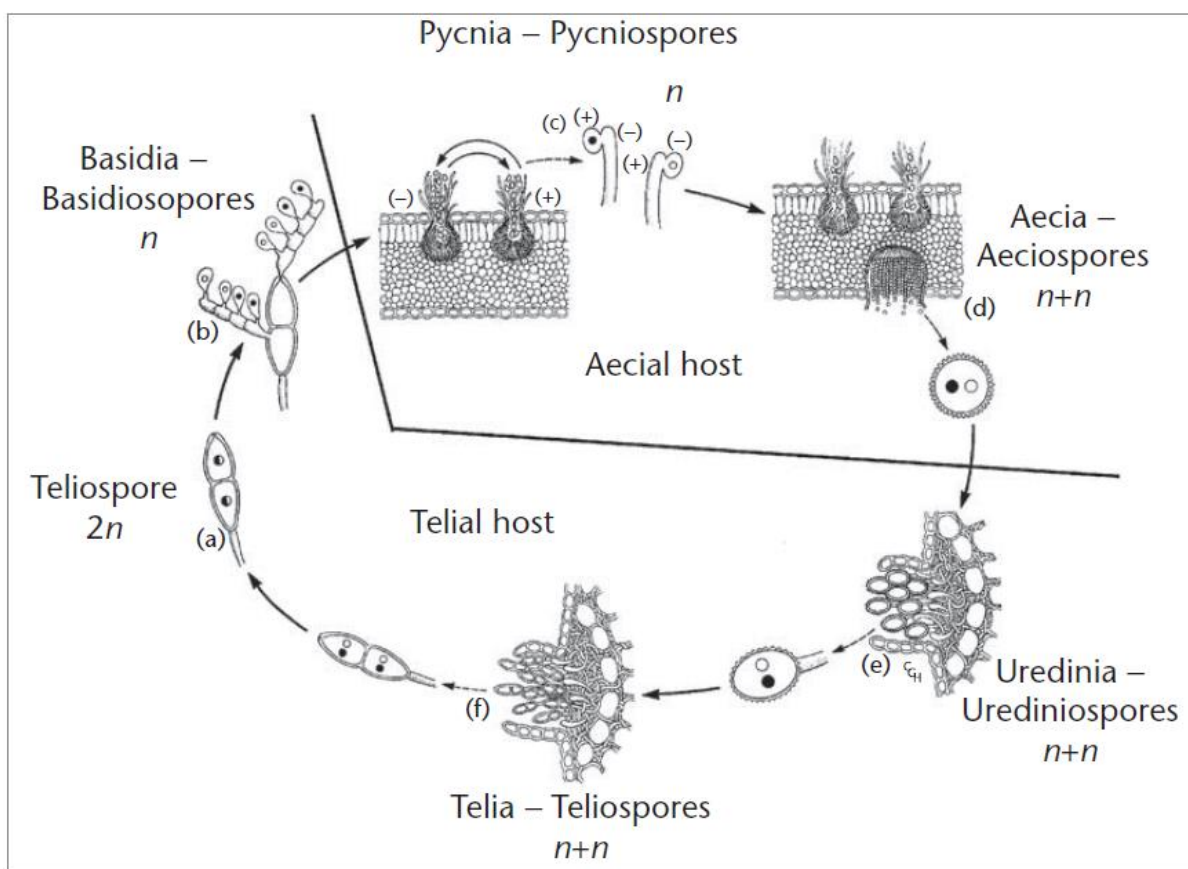
<sup>a</sup>N= Número de alelos; Na= Número de alelos diferentes; Ne= Número efectivo de alelos; I= índice de Shannon  $(=1-\sum p_i^2)$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del Alelo  $i$ th; Ho= Heterocigosidad observada; He= Heterocigosidad esperada; F<sub>IS</sub>= Índice de fijación. SE= Error estándar

**Tabla 12.** Matriz de distancias genéticas basadas en la diversidad de 14 loci de microsatélites de cepas de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* del Ecuador y muestras control de los EEUU.

Ec-1	Ec-2	Ec-3	Ec-4	Ec-5	Ec-6	Ec-7	Ec-8	Ec-9	Pst-35	Pst-37	Pst-127	
0												Ec-1
16	0											Ec-2
7	11	0										Ec-3
16	4	11	0									Ec-4
13	22	8	22	0								Ec-5
14	13	10	15	5	0							Ec-6
13	11	8	13	12	7	0						Ec-7
13	11	8	13	12	7	0	0					Ec-8
16	12	11	14	17	12	5	5	0				Ec-9
17	4	12	6	24	17	15	15	15	0			Pst-35
18	5	13	7	23	16	16	16	16	1	0		Pst-37
17	28	22	28	18	19	26	26	29	27	26	0	Pst-127

## **10. ANEXO**

**Anexo 1: Ciclo de vida de *Puccinia graminis* (Macrocíclica-heteroeecia).** (a) Teliospora Diploide, Madura, (b) Estadío Basidio con Basidiosporas, (c) Estadío Pycnial (Espermogonio), (d) Estadío Aecial, (e) Estadío Uredinial y (f) Estadío Telial (Kolmer, 2009).



## **Anexo 2: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON TIOCINANATO DE GUANIDINA**

Mantener alícuotas de Isopropanol al 100% en la congeladora a -20°C

### **Lisis de células y desnaturalización de la RNAsa**

1. Seleccionar de cada muestra una hoja seca infectada con roya.
2. Con ayuda de un estereoscopio, agujas y un bisturí cortar aproximadamente de 5 a 6 pequeños pedazos de hoja que presenten pústulas o esporas (Foto 1).
3. Colocar los pedazos en un tubo eppendorf de 1.5mL, con una pequeña cantidad de perlas de Zirconia y 300µl de Buffer de Lisis<sup>1</sup> previamente calentado a 55°C.
4. Utilizando un pistilo de plástico macerar cada muestra a partir de movimientos circulares (Foto 2).
5. Añadir en cada tubo eppendorf 4µL de Proteinasa K (20mg/mL) y dar un vórtex durante 1 Minuto.
6. Incubar las muestras a 55°C durante toda la noche.
7. Después de la incubación, homogenizar las muestras con un breve vórtex.
8. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.

### **Precipitación de proteínas**

1. Añadir 100µL de solución de precipitación<sup>2</sup> a la muestra de tejido macerado, colocar en el vórtex durante 10 a 20 segundos.
2. Centrifugar a 13000rpm durante 10 minutos. Repetir si es que no se ha formado un pellet firme.



3. Con una pipeta de 100µL se traslada el sobrenadante (que contiene el ADN) a un tubo nuevo de 1.5mL, descartar el tubo con el pellet que contiene proteínas y demás desechos.

### **Precipitación de ADN**

1. Añadir 300µL de solución de isopropanol al 100% frío y mezclar la solución invirtiendo varias veces el tubo cuidadosamente. Colocar las muestras a -20°C durante 15 minutos.
2. Centrifugar el contenido durante 5 minutos a 13000rpm
3. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN.
4. Añadir 300µL de etanol al 70% e invertir los tubos para lavar el pellet varias veces.
5. Centrifugar la solución resultante durante 5 minutos a 13000rpm y descartar el etanol.
6. Colocar todas las muestras dentro de una cámara de ventilación durante 20 a 30 minutos, para que el remanente de alcohol se evapore. Si se deshidrata demasiado será más difícil re-hidratarlo.

### **Tratamiento con NaOAc, rehidratación, y almacenamiento del ADN**

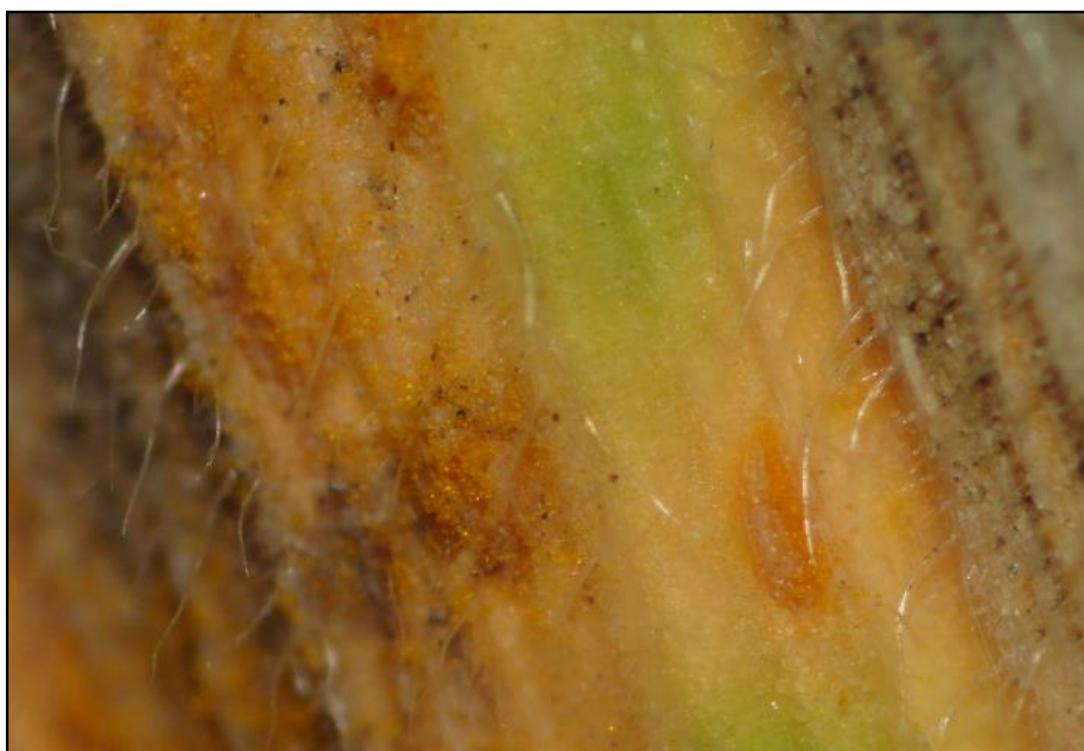
1. Añadir al pellet de cada muestra 100µL de 10mM Tri-HCl, pH 8.0 y dar un pequeño vórtex para que el contenido se resuspenda completamente.
2. Posteriormente, añadir 10µL de 3M NaOAc, y 100µL de isopropanol frío, e invertir los tubos varias veces.
3. Centrifugar las muestras a 13000rpm durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
4. En seguida, colocar 300µL de etanol al 70% e invertir varias veces cada tubo para lavar el pellet.
5. Centrifugar el contenido durante 5 minutos a 13000rpm y descartar el etanol.

6. Colocar todas las muestras dentro de una cámara de ventilación durante 20 a 30 minutos, para que el remanente de alcohol se evapore.
7. Finalmente, resuspender el pellet de cada muestra añadiendo 50µL de 0.1 TE pH 8.0 y se guardar este stock a -20°C. Las alícuotas de mayor dilución en dH<sub>2</sub>O se pueden guardar a 4°C

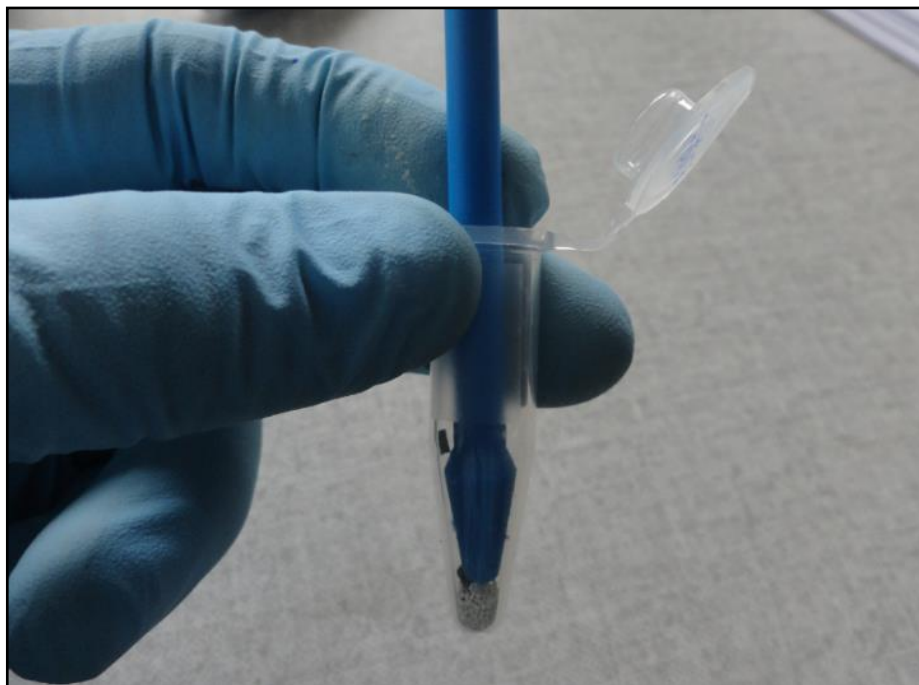
<sup>1</sup>**Buffer de Lisis:** 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS.

<sup>2</sup>**Solución de Precipitación:** 4M Isotiocianato de Guanidina, 0.1 Tris-HCl pH 7.5

**Foto 1:** Pústulas y esporas de *Puccinia holcina* parasitando una hoja de *Holcus lanatus*.



**Foto 2:** Maceración de hojas infectadas a partir de perlas de Zirconia y un Macerador.



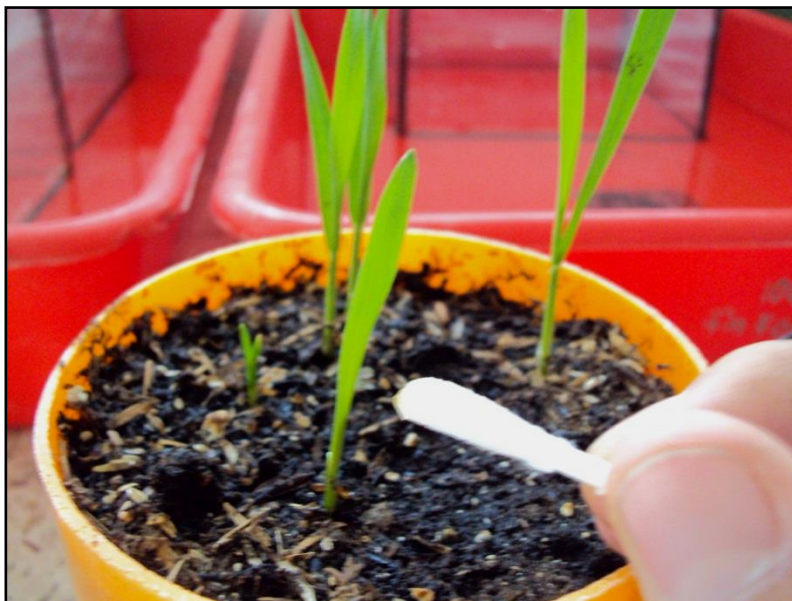
### **Anexo 3:** Obtención de monospóricos y multiplicación de esporas

**Foto 3:** Siembra de Semillas





**Foto 4:** Inoculación de esporas en el haz de hojas sanas de plantas de trigo susceptibles, variedad Moroco.



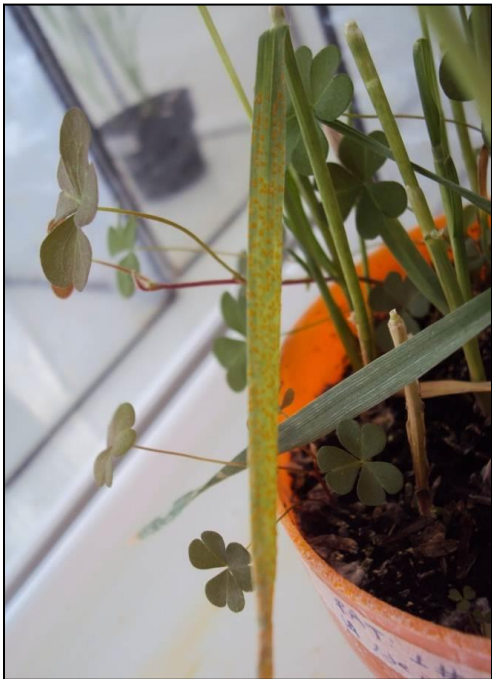
**Foto 5:** Planta infectada con Roya dentro de una cámara de aislamiento



**Foto 6:** Cuarto temperado a 14°C



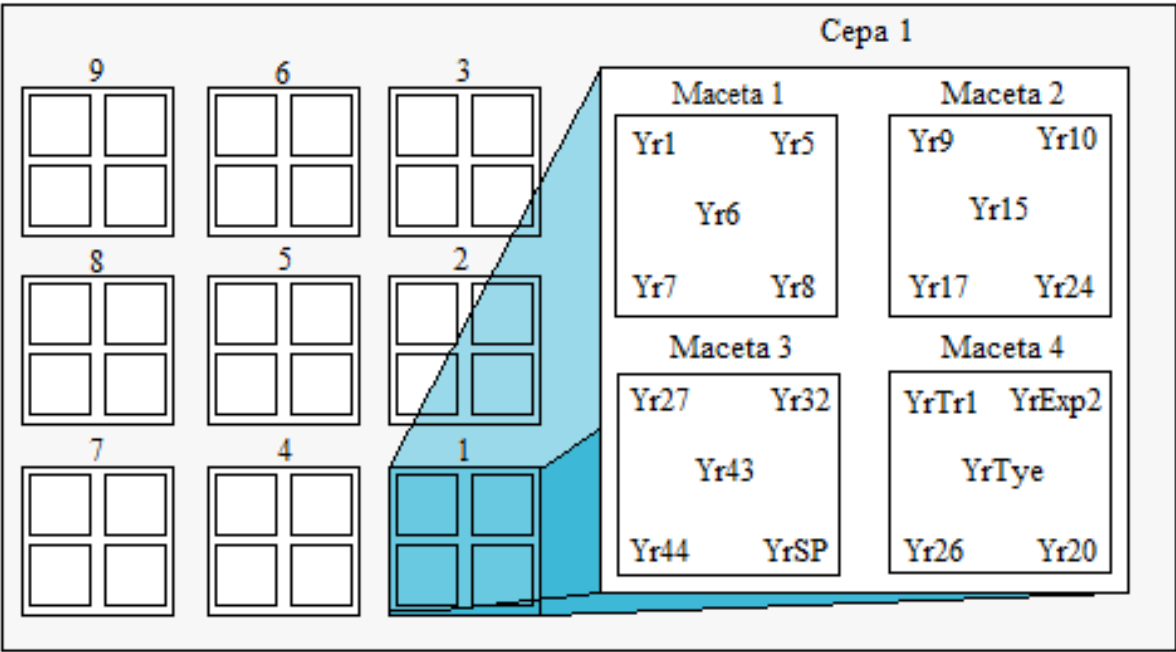
**Foto 7:** Primeras pústulas de roya en una hoja de trigo infectada



**Foto 8:** Recolección de esporas



**Anexo 4:** Siembra de semillas de diferenciales, en donde cada bandeja corresponde a 1 cepa, cada cepa posee 4 macetas, en las cuales se sembraron 5 semillas de cada raza de trigo específica para cada gen de resistencia.

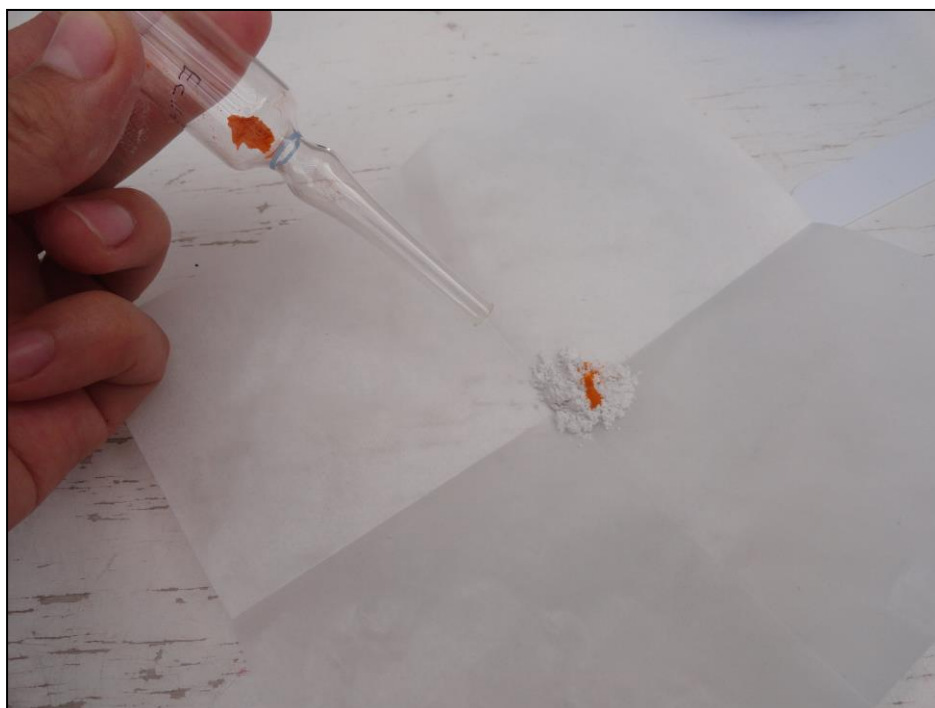


**Anexo 5:** Metodología para pruebas de virulencia

**Foto 9:** Siembra de semillas de los 20 distintos diferenciales



**Foto 10:** Esporas de 1 cepa de *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* colocadas en talco.





**Foto 11:** Mezcla de esporas y talco utilizando una regleta



**Foto 12:** Solución de esporas de 1 cepa de *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* y talco esparcidas en las hojas de los 20 diferenciales, utilizando un cotonete



**Foto 13:** Plantas de diferenciales inoculadas con 1 cepa de *Puccinia striiformis* f.sp *tritici*  
siendo rociadas con agua estéril, utilizando un aspersor

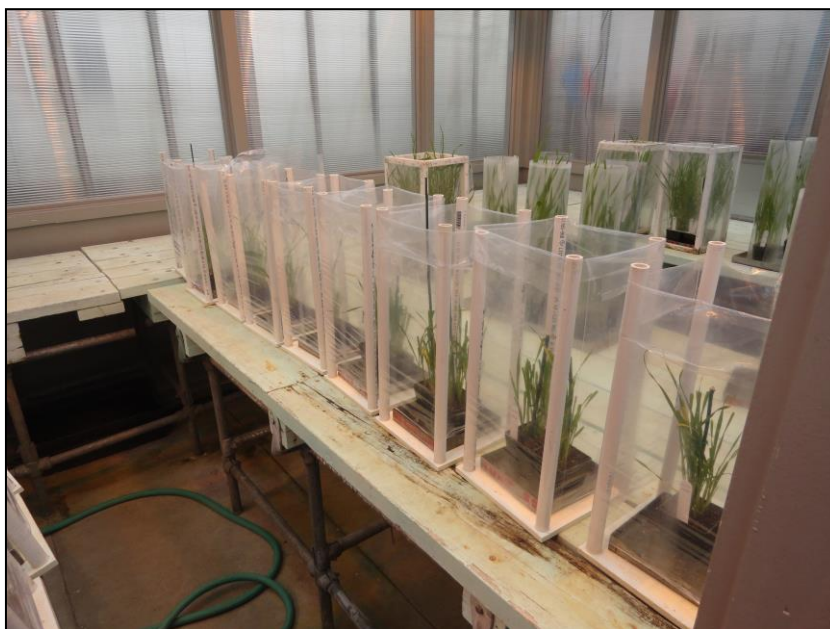


**Foto 14:** Cámara húmeda





**Foto 15:** Cámara fría, en la cual las plantas inoculadas reposaron durante 20 días hasta mostrar los síntomas.



**Foto 16:** Diferenciales infectados listos para el análisis de virulencia para la respectiva cepa inoculada.



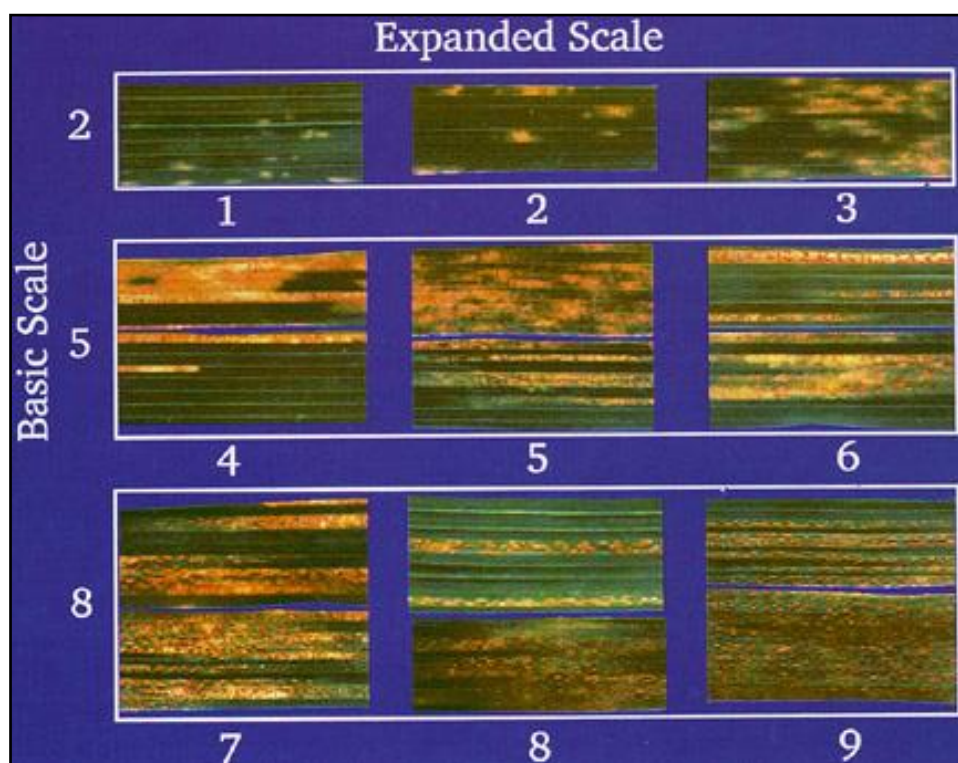
**Anexo 6:** Escala de virulencia de *Puccinia striiformis* en hojas de Trigo (*Triticum aestivum*)

(Line, 1992).

Tipo de Infección	Signos y síntomas de los diferentes tipos <sup>1</sup> de Infección
1	No hay signos o síntomas visibles
2	Manchas necróticas y/o cloróticas; sin esporulación
3	Manchas grandes o franjas necróticas y/o cloróticas; con rastros de esporulación
4	Manchas grandes o franjas necróticas y/o cloróticas; con esporulación leve
5	Manchas grandes o franjas necróticas y/o cloróticas; esporulación intermedia
6	Manchas grandes o franjas necróticas y/o cloróticas; esporulación moderada
7	Manchas grandes o franjas necróticas y/o cloróticas; esporulación abundante
8	Clorosis cercana al área de esporulación; esporulación abundante
9	Sin necrosis o clorosis; esporulación abundante

<sup>1</sup>Las manchas necróticas o y/o cloróticas son más comunes en plántulas, y las franjas se producen en estadíos tardíos en el crecimiento de la planta

**Anexo 7:** Escala básica y expandida para el análisis de los tipos de infección de *Puccinia striiformis* f.sp *tritici* en plantas adultas de trigo.



## **Anexo 8: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE ALTO RENDIMIENTO PARA ROYAS**

Para obtener ADN en mayor cantidad y mejor calidad el proceso de extracción debe realizarse con esporas frescas y secas.

1. Para cada muestra, agregar en un tubo eppendorf de 1.5ml aproximadamente 100ul de Arena autoclavada y 10 a 50mg de esporas.
2. Colocar todos los tubos en una gradilla y esta a su vez colocar en una centrífuga de alta velocidad (Mini Beadbeater (Biospec products, Inc) durante 2 a 4 minutos para romper las pared celular de las esporas.
3. Añadir 560µl de Buffer de extracción (2x CTAB) previamente calentado a 65°C. E invertir los tubos de 4 a 6 veces.
4. Colocar todos los tubos en baño maría a 65°C durante 45 min, e invertir delicadamente cada 15 minutos. Posteriormente, dejar enfriar durante 15 minutos, a temperatura ambiente
5. Agregar 400µl de cloroformo:Isopentil alcohol (24:1) a cada muestra, e invertir los tubos durante 3 minutos. Colocar las muestras en una centrifugadora (Allegra 25R, Beckman coulter Inc.) a 13000rpm, a 4°C durante 15 minutos.
6. Transferir 500µl de sobrenadante en tubos eppendorf nuevos.
7. Añadir 500µl de isopropanol frío, e invertir el contenido 4 veces. Y colocar las muestras a -20°C durante 30 minutos.
8. A continuación centrifugar las muestras durante 15 minutos a 13000rpm a 4°C, y eliminar el sobrenadante.

9. Colocar 500  $\mu$ l de etanol al 70 % en cada tubo, y centrifugar durante 10 minutos a 13000rpm a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante y colocar los tubos en una cámara ventilada durante 30 minutos para que el remanente de alcohol se evapore.
11. Finalmente añadir 100 $\mu$ l de solución TE (Contiene 20 $\mu$ g/ml RNAsa A) para diluir el pellet completamente e incubar durante 1 a 3 horas a 37°C. Medir la concentración del ADN a partir del espectro del Nanodrop.

Nota: 2x CTAB buffer=1.4M NaCl; 100mM Tris-HCl pH8.0;

2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide); 20mM EDTA; 0.5% Na Bisulfite; (**sodium sulfite**) 1% 2-mercaptoethanol (Se agregó buffer de lisis después de cada uso).

## **Anexo 9: PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES A PARTIR DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (*Chen et al.*)**

### **1. Preparación de la solución de Acrilamida al 5%**

Para cada gel de Acrilamida utilizar 55ml de solución de acrilamida 5%

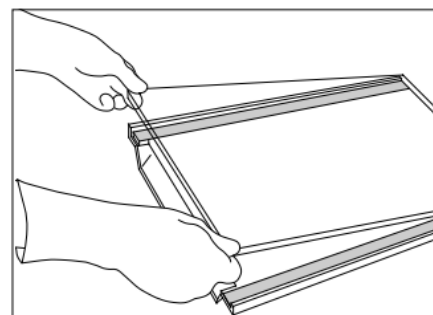
### **2. Preparación del Gel de Poliacrilamida**

- a) Para la preparación del gel de poliacrilamida, la cámara (, así como los vidrios deben estar completamente limpios. Por lo que, después de cada lavado, ambos vidrios (grande y pequeño) deben limpiarse con 95% de etanol y papel toalla delgado para eliminar impurezas.
- b) Esparcir en una superficie del vidrio grande (en donde posteriormente se colocará el gel de poliacrilamida) 3ml de silicona, utilizando papel toalla saturada con movimientos circulares y de derecha a izquierda, hasta cubrir toda la superficie. Dejar reposar durante 5min para que la solución se seque.
- c) En una cámara de ventilación preparar la solución atrayente en un tubo Eppendorf, compuesta de 3µl de “Bind Silane” (Promego), 1ml de ácido acético al 0.5% y 1.5 ml de etanol al 95%. Microcentrifugar la solución durante 10 segundos y distribuirla uniformemente, utilizando un papel toalla saturado, en toda la superficie del vidrio pequeño a partir de movimientos de derecha a izquierda y de arriba a abajo hasta cubrir

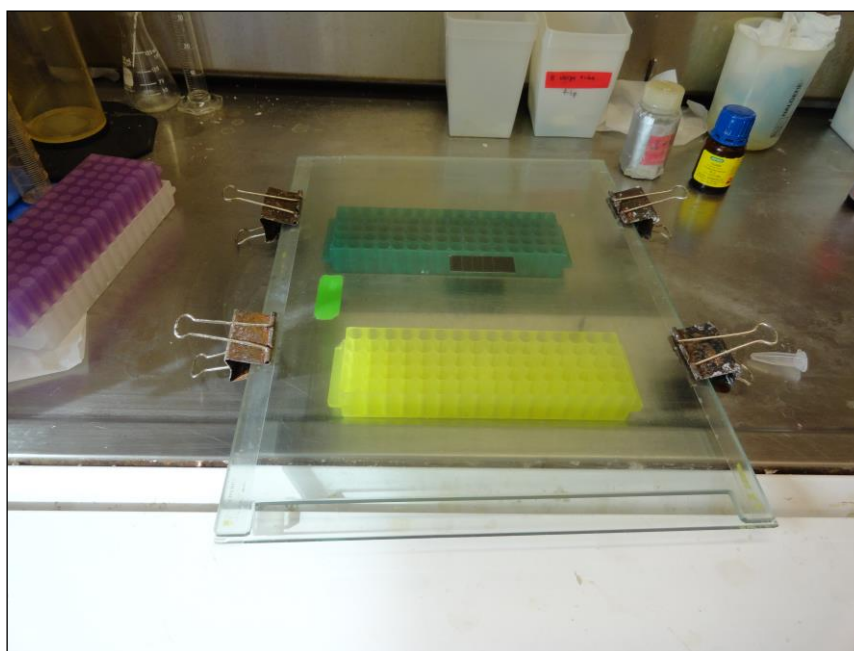
completamente la superficie. Dejar reposar durante 5min hasta que la solución se seque completamente.

- d) Limpiar ambos vidrios con un pedazo de papel toalla delgado, saturado con alcohol al 95%, para eliminar el exceso de ambas soluciones (Suprimir este paso puede causar que el gel se adhiera a ambos vidrios, ocasionando su destrucción en el momento de la separación después de la electroforesis)

- e) Colocar un espaciador de 0.4mm en cada lado del vidrio grande. Y cuidadosamente (evitando que las superficies tratadas se toquen) colocar el vidrio pequeño sobre el grande, y alinear

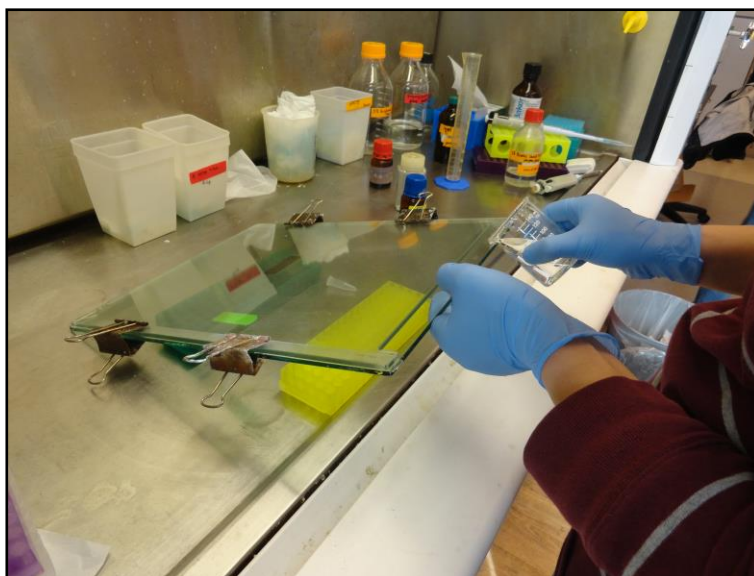


- f) A continuación utilizando cinta adhesiva cubrir ambos lados y la base de los vidrios, para evitar que el gel se drene y asegurar todas las partes utilizando pinzas.

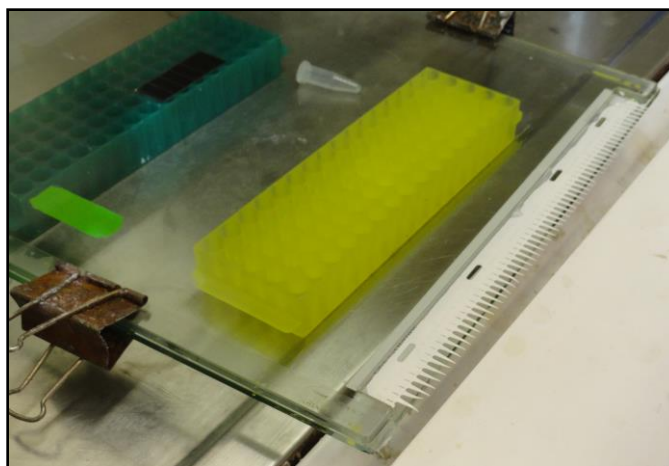




- g) Preparar la solución de poliacrilamida en un vaso de precipitación, añadiendo 55ml de solución de acrilamida al 5%, 380 $\mu$ l de amonio persulfato al 10% y 35 $\mu$ l de TEMED. Inmediata y cuidadosamente verter la solución entre los dos vidrios, desde un solo lado y manteniendo un flujo constante para evitar la formación de burbujas.



- h) Posicionar el gel horizontalmente e insertar una regleta dentada del lado plano (aproximadamente de 6 a 8 mm del borde del vidrio). Y asegurar con pinzas pequeñas los vidrios para evitar que se separen a más de 0.4mm (grosor de la regleta dentada). Este paso evita que las muestras, no se mezclen por el espacio extra que se formaría entre cada diente al momento de cargarlas.



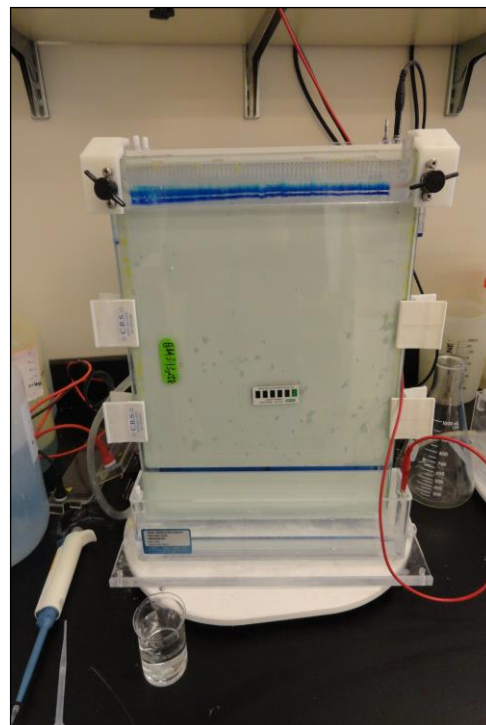
- i) La polimerización se produce en los siguientes 30 a 60 minutos. Para evitar que se seque el gel, colocar en el borde superior de la cámara papel toalla empapado con Buffer TBE 1 X y cubrir con plástico.
- j) Después de la polimerización, remover la cinta adhesiva y las pinzas y limpiar los remanentes de gel de la parte externa de los vidrios con papel toalla saturado con agua desionizada.

### **3. Electroforesis:**

- a) Preparar 1000ml de Buffer TBE al 1X, de los cuales, añadir 300ml en la base de la cámara de electroforesis, ensamblar ambos vidrios al resto de la cámara utilizando pinzas, procurando que 1cm de la base se encuentre sumergido en el buffer, y que el vidrio grande se encuentre orientado hacia delante de la cámara. Añadir 500ml del buffer TBE 1X en el área superior de la cámara de electroforesis.
- b) Cuidadosamente retirar la regleta dentada.
- c) Con una jeringuilla con aguja de 1cc, extraer un poco de TBE de la cámara y limpiar el área resultante para eliminar las burbujas de aire, pedazos de poliacrilamida sueltos y úrea. E insertar nuevamente la regleta, pero esta vez del lado dentado, haciendo que cada diente toque levemente la superficie del gel.
- d) Encender la fuente de poder a 1600 voltios hasta que el gel alcance una temperatura de 50°C. Este paso toma alrededor de 40 a 60 minutos. Una vez obtenida la temperatura deseada, detener la fuente de poder y remover la úrea utilizando una jeringuilla llena con Buffer TBE.



- e) Continuar corriendo el gel a 1600 voltios. Y al mismo tiempo, agregar a las muestras de PCR 5 $\mu$ l de Buffer de carga (98% Formamida + 10mM EDTA pH 8.0 + 0,5%(w/v) Azul de Bromofenol +0,5 (w/v) Xylene Cyanol)), centrifugar las muestras a 3000rpm por 1 minuto y desnaturar los productos PCR a 94°C por 5 minutos e inmediatamente en hielo durante 3 minutos.
- f) Detener la electricidad y volver a remover la úrea formada utilizando una jeringuilla llena de buffer TBE. Cuidadosamente insertar la regleta dentada, con los dientes tocando levemente la superficie del gel. Y de 3 a 4  $\mu$ l de cada muestra dentro de cada pocillo.
- g) Correr el gel durante 2 horas a 1400voltios



#### 4. Tinción de Planta:

- a) Cuando la electroforesis ha finalizado, detener la electricidad y drenar el Buffer del área superior de la cámara. Remover los vidrios y colocarlos sobre una mesa. Después dejar enfriar durante 10 a 15 minutos, remover las pinzas y los espaciadores de ambos lados de los vidrios. Con la ayuda de una espátula cuidadosamente, separar ambos vidrios. El gel debe mantenerse adherido al vidrio pequeño.
- b) Colocar el gel dentro de una bandeja con 2 litros de solución de fijación (10% de ácido glacial acético) durante 1 hora.

- c) A continuación lavar el gel con 2 litros de agua desionizada ddH<sub>2</sub>O durante 2 minutos.  
Repetir este paso 2 veces.
- d) Teñir el gel durante 30 a 40 minutos en solución de tinción (1.5 - 2gr de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) en 2000 ml de H<sub>2</sub>O).
- e) Lavar el gel en Agua desionizada por exactamente 9 segundos
- f) Inmediatamente colocar el gel en 2000 ml de solución de desarrollo recientemente preparada y calentada a 10°C (10gr de Hidróxido de sodio (NaOH), 3ml de 37% de formaldehído (H<sub>2</sub>O) en 2000 ml de ddH<sub>2</sub>O) hasta que las bandas sean visibles. Este paso toma usualmente no más de 5 minutos. No permitir que el gel se sobre desarrolle.
- g) Lavar el gel durante 3 minutos en 1000ml de Agua desionizada.
- h) Finalmente posicionar el gel de forma vertical y dejar secar durante toda la noche.

## Anexo 10: Protocolo para Geles de Poliacrilamida (Tinción por Plata)

### Preparación de Reactivos para el Gel de Poliacrilamida

#### a) Solución Stock de Acrilamida-Bis Acrilamida (19:1):

Colocar en un vaso de precipitación 142.5gr de Acrilamida + 7.5gr Bis-Acrilamida. Aforar a 500ml de Agua Mili-Q y mezclar. Almacenar en un Frasco de 1L, cubierto con papel aluminio.

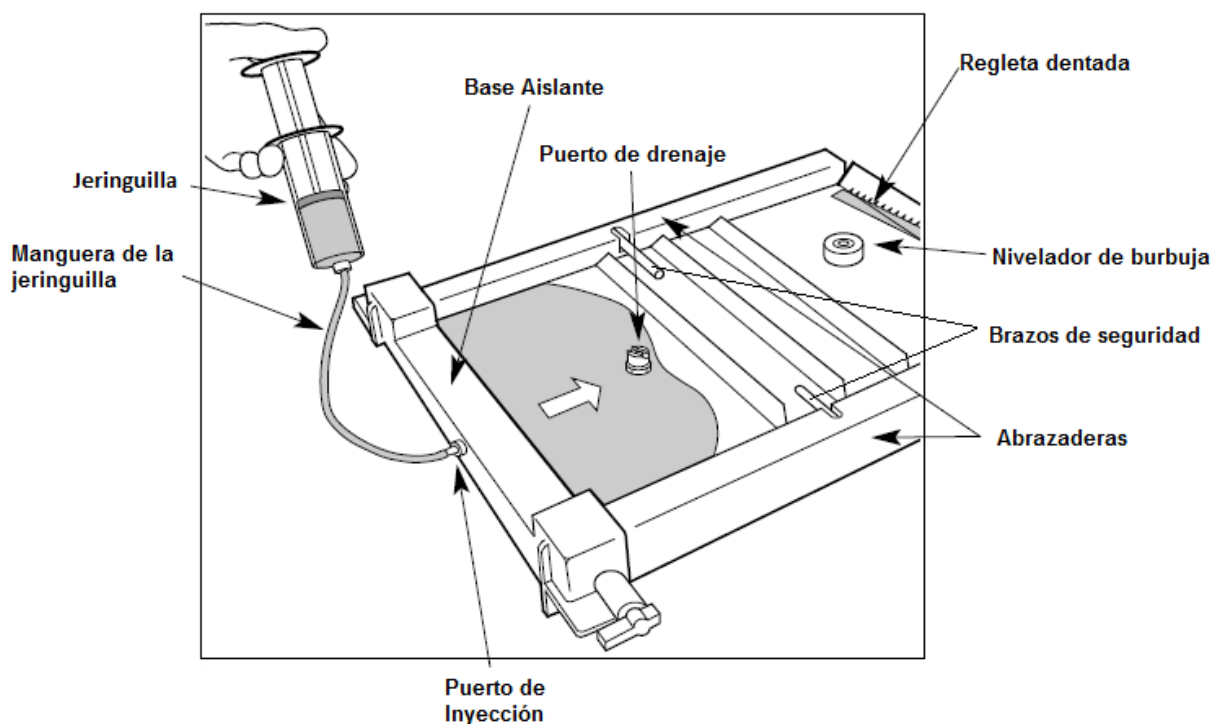
#### a) Solución de Acrilamida al 6%/5M Úrea:

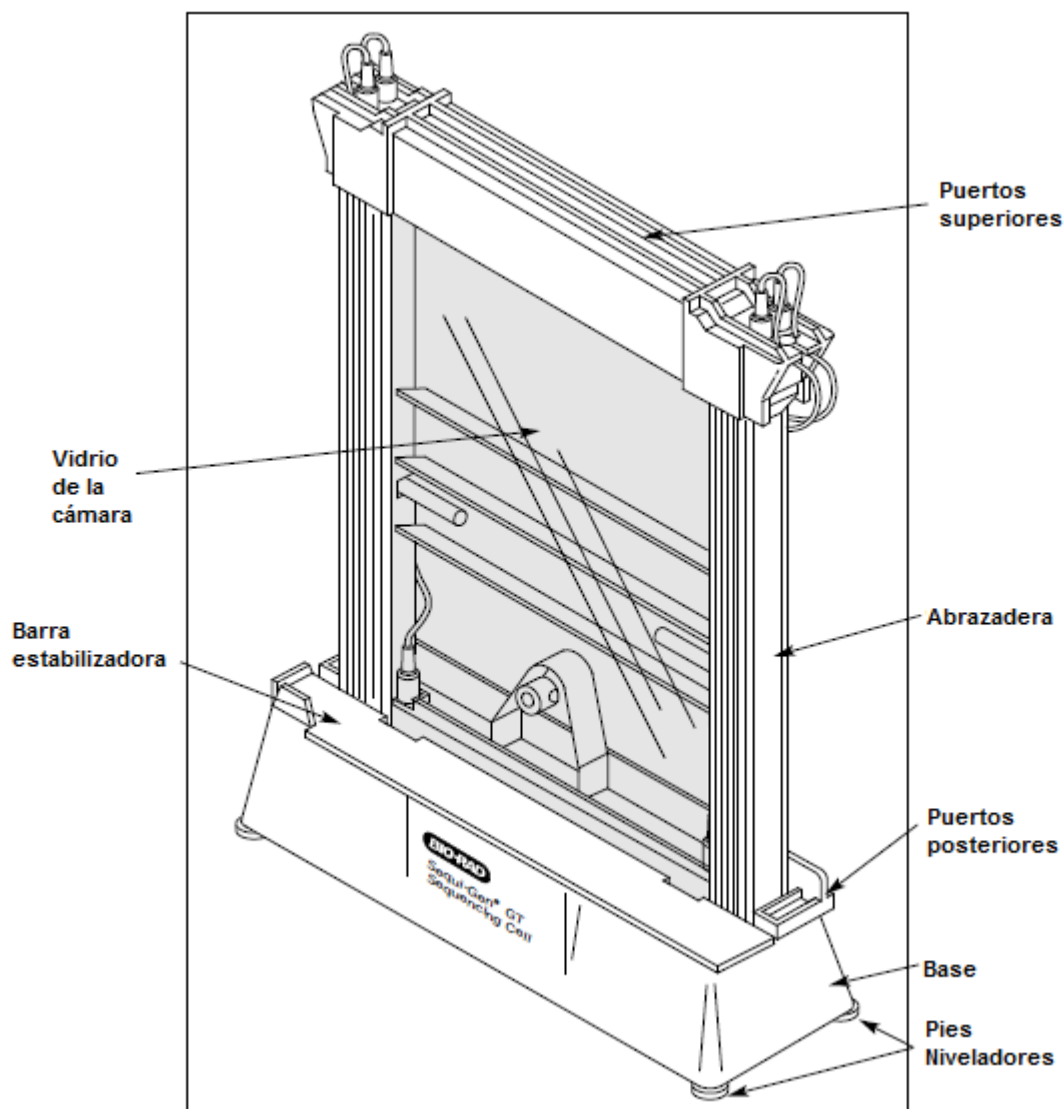
Colocar en un vaso de precipitación 450.42gr de Úrea + 200ml de la solución Stock de Acrilamida-Bis Acrilamida (19:1) y mezclar. Aforar a 1000ml de Solución TBE al 1x. Almacenar en un Frasco de 1L, cubierto con papel aluminio.

#### b) Persulfato de Amonio (APS) 10%:

Colocar en un vaso de precipitación pequeño 0.2gr de Persulfato de Amonio + 2ml de  $H_2O$  y Mezclar. Almacenar en un tubo de 15ml recubierto con papel aluminio.

## 2. Partes de la cámara

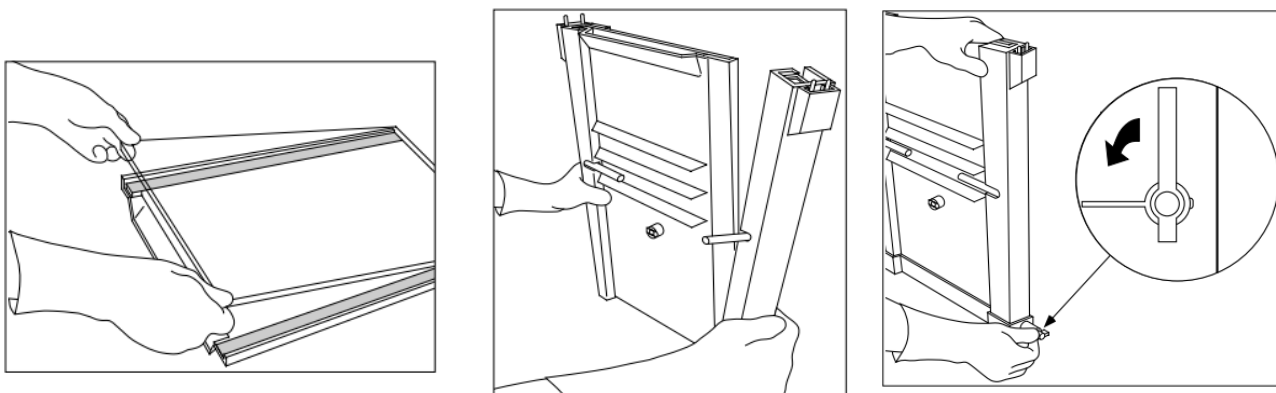




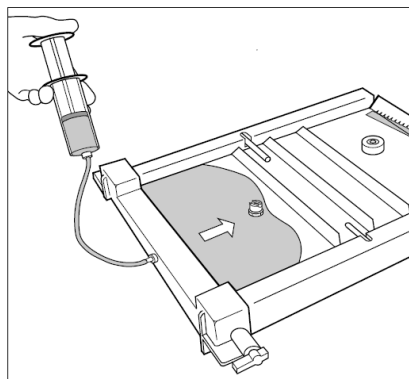
### 3. Preparación del Gel de Poliacrilamida:

- Previamente, antes de la preparación del gel, asegurarse de que la cámara así como los vidrios se encuentren completamente limpios.
- Con un marcador, marcar en la esquina superior del vidrio la cara en donde se colocará la solución atrayente.
- Limpiar con etanol al 95% y papel toalla delgado el vidrio y el vidrio de la cámara. (Tratar siempre ambos vidrios por separado, utilizar guantes y evitar tocar el lado de ambos vidrios en donde se colocaran las respectivas soluciones).

- d) Aplicar en el vidrio de la cámara 1 ml de solución RAIN (Solución Repelente), y distribuir uniformemente, con un papel toalla delgado, haciendo movimientos de derecha a izquierda hasta cubrir completamente la superficie. Esperar aproximadamente 5 min hasta que la solución se seque.
- e) En un área bien ventilada. Preparar la Solución Atrayente, añadiendo en un tubo Eppendorf 1.5ml de etanol al 95% + 4.5µl de Bind Silane + 6µl de ácido acético glacial al 0.5%. Microcentrifugar la solución. Colocar la solución en el vidrio y distribuirla uniformemente con un pedazo de papel toalla delgado, haciendo movimientos de derecha a izquierda y de arriba abajo hasta cubrir completamente la superficie. Esperar aproximadamente 5 min hasta que la solución se seque completamente
- f) Limpiar ambos vidrios con un pedazo de papel toalla delgado, saturado con alcohol al 95%, para eliminar el exceso de ambas soluciones (Suprimir este paso puede causar que el gel se adhiera a ambos vidrios, ocasionando su destrucción en el momento de la separación después de la electroforesis).
- g) Colocar un espaciador de 0.4mm en cada lado del vidrio de la cámara. Con cuidado colocar encima el vidrio con la solución atrayente evitando que las superficies tratadas se toquen entre sí. Ensamblar las abrazaderas, una a cada lado de la cámara, alinear y asegurar todas las partes moviendo los brazos de seguridad hacia el plato. Finalmente colocar todo dentro de la base aislante y asegurarla a la cámara.



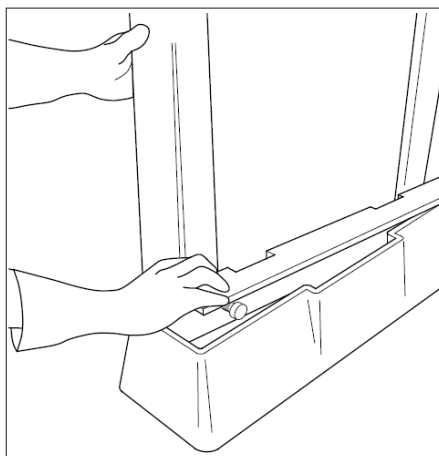
- h) En un Vaso de precipitación de 85ml preparar el Gel de Acrilamida, colocando 75ml de Acrilamida al 6%/5M Úrea + 75µl TEMED +187.5µl APS 10% y mezclar. Una vez homogenizada la solución, tomar una Jeringuilla de 140cc y succionar el contenido del Vaso de precipitación.



- i) Recostar la cámara y nivelarla con ayuda de un nivelador de burbuja de agua y plastilina, hasta que quede totalmente horizontal. Localizar el puerto de inyección en la base de la cámara e inyectar el contenido de la Jeringuilla de manera constante para evitar la formación de burbujas, hasta que la solución emerja por el borde superior del vidrio (La acrilamida restante dentro de la Jeringuilla servirá como indicador de que esta se ha polimerizado).
- j) En el Borde superior insertar la regleta dentada del lado plano (Aproximadamente de 6 a 8 mm del borde del vidrio). Asegurar con Pinzas los vidrios, para evitar que se separen a más de 0,4mm (grosor de la regleta dentada). Este paso evita que las muestras, no se mezclen al momento de cargarlas por el espacio extra que se formaría entre cada diente
- k) La polimerización se producirá en los siguientes 30 a 60 minutos. Para evitar que se seque el gel, colocar en el borde superior de la cámara papel toalla empapado con Buffer TBE 1 X y cubrir con plástico.
- l) Después de la polimerización remover la manguera de la jeringuilla del puerto de inyección, retirar el papel toalla empapado, las pinzas del borde superior de la cámara y la base aislante. Y lavar las partes.

### 3. Electroforesis:

- a) Preparar 2000ml de Buffer TBE al 1X.
- b) Ensamblar el equipo colocando la cámara dentro de la base universal e insertar la barra estabilizadora. Nivelar la base universal ajustando los pies niveladores.



- c) Colocar 350 a 500ml de Buffer TBE al 1X en la base, y aproximadamente 500ml en la cámara de relleno, hasta casi alcanzar el borde superior.  
El Buffer TBE 1x puede ser calentado durante 2-3 minutos antes de colocarlo en la cámara, esto permite reducir el tiempo necesario para que el gel se encuentre a la temperatura apropiada antes de cargar las muestras.
- d) Cuidadosamente retirar la regleta dentada. Con una jeringuilla de 1cc, con aguja, extraer un poco de TBE de la cámara y limpiar el área resultante para eliminar las burbujas de aire, pedazos de poliacrilamida sueltos y la úrea. Insertar nuevamente la regleta, pero esta vez del lado dentado, haciendo que cada diente toque levemente la superficie del gel.
- e) Conectar los puertos posteriores, sellar la cámara conectando los puertos superiores y finalmente conectar toda la cámara a la fuente de poder.
- f) Adherir el indicador de la temperatura cerca del centro del vidrio.
- g) Encender la fuente de poder y programarla a una temperatura de 50°C y a un voltaje de 70W. Pre-correr el gel hasta que alcance la temperatura indicada, aproximadamente de 40 a 60 min. Periódicamente asegurarse de que el nivel de TBE de la cámara de relleno se mantenga.
- h) Colocar en cada muestra resultante de la PCR 10µl de Buffer de carga Formamida (98% Formamida + 10mM EDTA pH 8.0 + 0,5%(w/v) Azul de Bromofenol +0,5 (w/v) Xylene Cyanol). Una vez que el gel haya alcanzado la temperatura indicada, desnaturalizar las muestras a una temperatura de 94°C x 5 minutos e inmediatamente colocar en hielo por 5 minutos.

- i) Para medir el peso de cada banda, se utiliza la escalera de 30-330pb AFLPs Ladder previamente preparada (5µl de 30-330pb AFLP ladder + 5µl de TE o H<sub>2</sub>O Milli-Q + 25µl de Formamida). Antes de ser cargada en el gel, se debe desnaturalizar a una temperatura de 70°C por 5 min.
- j) Cuando la fuente de poder indique la temperatura de 50°C, detener el proceso y desconectar los puertos superiores. Con una jeringuilla con aguja, limpiar nuevamente la úrea formada en el área de la regleta.
- k) Cargar de 3 a 4 µl de cada muestra dentro de cada pocillo, y finalmente colocar a ambos lados la escalera.
- l) Correr las muestras durante 30-40 minutos, dependiendo del tamaño de las bandas. Normalmente el tiempo de electroforesis es monitoreado por la observación del desplazamiento del colorante Azul de Bromofenol (Azul rápido) o del Xylene Cyanol (Azul lento) durante la electroforesis.

#### **4. Tinción en Plata:**

##### **a) Reactivo para la Fijación Fría:**

Colocar en una probeta 100ml de etanol absoluto al 10% + 5ml de Ácido acético glacial al 0,5% y Aforar a 1000ml con Agua Milli-Q. Almacenar en un frasco de 1L a una temperatura de 4°C (asegurarse de que el reactivo se encuentre frío antes de ser utilizado).

##### **b) Reactivo de Tinción con Nitrato de Plata:**

Colocar en una probeta 6ml de plata al 25% + 1,5ml de Formaldehído al 37% y aforar a 1000ml con Agua Milli-Q. Almacenar en un frasco de 1L previamente envuelto de papel aluminio a una temperatura de 4°C.

##### **c) Reactivo de Revelado**

Colocar en 1 vaso de precipitación de 500ml 15gr de NaOH + 2ml de Formaldehído y Aforar a 500ml de Agua Mili-Q. Agitar hasta que se forme una solución homogénea, colocar en un frasco de 1L y Aforar a 1000ml con Agua Milli-Q. Elaborar este reactivo antes del revelado.



- d) Una vez que las bandas han migrado el espacio deseado. Apagar la fuente de poder y remover los puertos superiores.
- e) Insertar la manguera de drenaje en el puerto de drenaje y vaciar la cámara de relleno. Deshacerse del líquido restante. Y retirar la cámara de la base. Desensamblar las abrazaderas.
- f) Cuidadosamente separar el vidrio de la cámara del vidrio, el gel debe quedarse adherido en este último. Retirar los espaciadores.
- g) Colocar el gel en una bandeja con la solución de fijación fría durante 10 minutos. Con agitación permanente. Una vez terminada la fijación descartar la solución.
- h) En una segunda bandeja sumergir en la solución de tinción de Nitrito de Plata el gel durante 10 minutos. Con agitación permanente. Una vez terminada la tinción almacenar la solución en el Frasco y refrigerar.
- i) En una tercera bandeja lavar el gel con agua Milli-Q durante **10 segundos** **exactamente** y retirar.
- j) Inmediatamente, colocar el gel en una bandeja con la Solución de revelado, hasta que las bandas se vuelvan visibles. Este paso usualmente toma no más de 5 minutos.
- k) Lavar nuevamente con agua Milli-Q y posicionar el gel de forma vertical y en la luz para que se definan mejor las bandas y el gel se seque.

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Carla Elizabeth Vivanco Cárdenas, C.I. 1711525111 autora del trabajo de Graduación titulado: “Estudio preliminar de la diversidad genética del género *Puccinia* presente en Poaceae en la Sierra Ecuatoriana con énfasis en *Puccinia striiformis*”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 04 de Noviembre del 2013

Carla Elizabeth Vivanco Cárdenas

C.I.: 1711525111